

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE QUÍMICA

**“OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE
ANTIMICROBIANOS EM CAMA DE FRANGO POR CLAE-FLU.”**

Victor Damasceno Pavani

Araraquara – SP

Dezembro – 2011

Victor Damasceno Pavani

**“OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE
ANTIMICROBIANOS EM CAMA DE FRANGO POR CLAE-FLU.”**

Monografia apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharelado em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Mary Rosa Rodrigues de Marchi

Araraquara

2011

Dedicatória

Este trabalho é dedicado aos meus pais, irmãos e pessoas intimamente ligadas, que no período de desenvolvimento deste trabalho, ajudaram com carinho, paciência e compreensão.

Agradecimentos

À minha orientadora, Mary, pelo aperfeiçoamento profissional;

À Denise, pela a amizade sincera e paciência nos momentos mais difíceis;

Ao Grupo de Estudos em Saúde Ambiental e Contaminantes Orgânicos (GRESO), pelos esclarecimentos e oportunidade de trabalho;

Ao PIBIC, pelo apoio financeiro;

Aos professores, colegas e funcionários do curso, pelo incentivo e prontidão;

E as Republicas “Espanha 1515” e “Xurupitas Farm” pelos momentos de descontração e esclarecimentos.

Sumário

1. Introdução.....	8
1.1. Aspecto econômico.....	8
1.2. Manejo.....	9
1.3. Problema Ambiental.....	12
1.4. Escolha dos Antimicrobianos estudados.....	14
1.5. Informações gerais dos antimicrobianos estudados.....	15
1.6. Ocorrência dos antimicrobianos selecionados.....	16
1.7. Métodos analíticos para determinação de fluoroquinolonas em matrizes de cama de frango, solo e água superficial.....	17
2. Objetivo.....	22
3. Matérias e Métodos.....	23
3.1. Matérias.....	23
3.1.1. Padrões Analíticos e Solventes.....	23
3.1.2. Vidraria e Equipamentos.....	23
3.2. Métodos.....	24
3.2.1. Limpeza de Vidraria.....	24
3.2.2. Condições Cromatográficas.....	24
3.2.3. Preparo das Soluções dos Padrões.....	24
3.2.4. Construção das curvas analíticas e determinação da linearidade do detector (Varian 920-LC/FLU).....	25
3.2.5. Determinação dos limites de detecção e de quantificação equipamento (Varian 920-LC/FLU).....	25
3.2.6. Preparo inicial das amostras de cama de frango.....	26
3.2.7. Otimização do método de extração proposto para análise dos antimicrobianos ciprofloxacina, norfloxacina e enrofloxacin em cama de frango.....	27
3.2.8. Avaliação do método proposto (estudo de recuperação).....	28
3.2.9. Avaliação do efeito matriz.....	28

3.2.10. Determinação dos limites quantificação do método.....	29
3.2.11. Análise das amostras por LC-MS/MS.....	29
4. Resultados e Discussões.....	31
4.1. Condições Cromatográficas.....	31
4.1.2. Método proposto.....	31
4.1.3. Parâmetros cromatográficos.....	35
4.2. Linearidade de resposta do detector (CLAE-FLU, Varian 920).....	36
4.2.1. Curvas analíticas (CLAE-FLU, Varian 920).....	37
4.3. Limites de detecção e quantificação do equipamento (CLAE-FLU, Varian 920.....	38
4.4. Branco do método.....	38
4.5. Avaliação da amostra de cama de frango.....	39
4.6. Avaliação do efeito matriz.....	39
4.7. Exatidão e Precisão.....	42
4.8. Análise dos padrões analíticos em LC-ESI-MS/MS-MRM-QTrap.....	44
4.9. Análise das amostras de cama de frango.....	46
4.9.1. Cama de frango orgânica, obtida da UNESP Jaboticabal.....	46
4.9.2. Cama de frango comercial, obtidas de produtores de frango de corte na região de Araraquara.....	47
5. Conclusão.....	50
REFERÊNCIAS.....	51

Resumo

O extraordinário desenvolvimento da produção avícola, particularmente no setor de frango de corte, tornou o Brasil um importante produtor e exportador de carne de frango. Esse fato aliado a proibição da utilização de cama de frango como ração para ruminantes pela Instrução Normativa nº15 de 17 de julho de 2001, fez com que este resíduo se tornasse um problema ecológico e de saúde pública de alta relevância, tanto pelo volume de resíduos gerado, quanto pela composição do mesmo, que pode conter diversos fármacos utilizados neste tipo de manejo, além de uréia, que após a oxidação natural no ambiente, resulta em nitrato que tem alto poder de contaminação de mananciais hídricos, principalmente subterrâneos. Dentre as substâncias que podem estar presentes na cama de frango, estão os antimicrobianos, utilizados como promotores de crescimento das aves. No Brasil, são pouquíssimos os trabalhos dedicados a investigar a ocorrência e o impacto ambiental de antimicrobianos. Desta maneira, este trabalho teve como objetivo otimizar e validar método para análise de três fluoroquinolonas (ciprofloxacina, norfloxacina e enrofloxacina) em cama de frango. O método estudado baseou-se em trabalhos da literatura em que moléculas similares foram analisadas em diversas matrizes, compreendendo a extração em ultrassom com acetonitrila acidificada com ácido acético (3% v/v) e análise por CLAE-FLU, modo isocrático com a fase móvel composta por 0,02 M H_3PO_4 :ACN (83:17, v/v). Foram avaliados os parâmetros cromatográficos quanto à resolução, eficiência, linearidade e limites de detecção e quantificação. A faixa de resposta linear situou entre 10 e 170 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os três analitos. O tempo de análise do método cromatográfico otimizado é de 7,5 minutos. Avaliou-se também o efeito de matriz que foi significativo para norfloxacina e ciprofloxacina, correspondendo a 16 e 20%, respectivamente. Para a enrofloxacina a amostra testemunha apresentou um interferente no mesmo tempo de retenção, que impossibilitou a determinação deste parâmetro. Quanto ao método analítico a exatidão, expressa como porcentagem de recuperação situou-se entre 140 e 170% (amostra enriquecida a 100 ng g^{-1}), a precisão (CV das replicatas do ensaio de recuperação) esteve entre 3 e 17%. Esta recuperação poderá ser baixado pela utilização de uma etapa adicional de limpeza do extrato, antes da análise por CLAE-FLU, utilizando por exemplo, SPE. O método validado foi aplicado em amostras de cama de frango comerciais obtidas de produtores de frango de corte na região de Araraquara e também em cama de frango orgânica (isenta de antimicrobianos) fornecida por pesquisadores da UNESP de Jaboticabal. Utilizando-se a confirmação por LC-MS/MS, os resultados indicaram a presença de enrofloxacina e ciprofloxacina apenas nas amostras comerciais.

Palavras-chaves: fluoroquinolonas, cama de frango, ambiente.

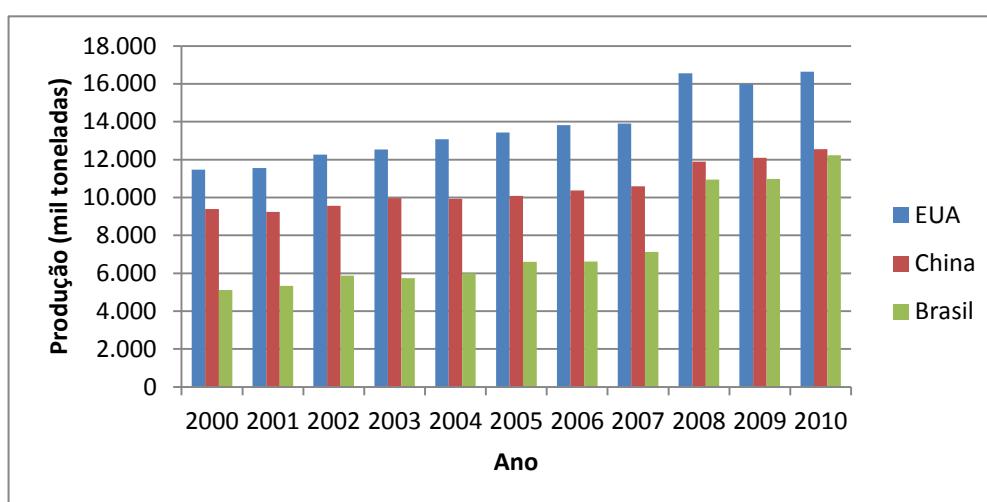
1. Introdução

1.1. Aspecto econômico

No Brasil, a carne de frango tem desempenhado importante papel econômico, tanto na geração de postos de trabalho quanto na exportação. Na última década, o Brasil tem se mantido como o terceiro produtor mundial, sendo superado pelos EUA e China. No entanto, em 2010, esta produção superou a marca de 12 milhões de toneladas (Figura 1).

Figura 1: Produção de carne de frango de 2000 a 2010 dos principais produtores mundiais.

Fonte: Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frango (ABEF)

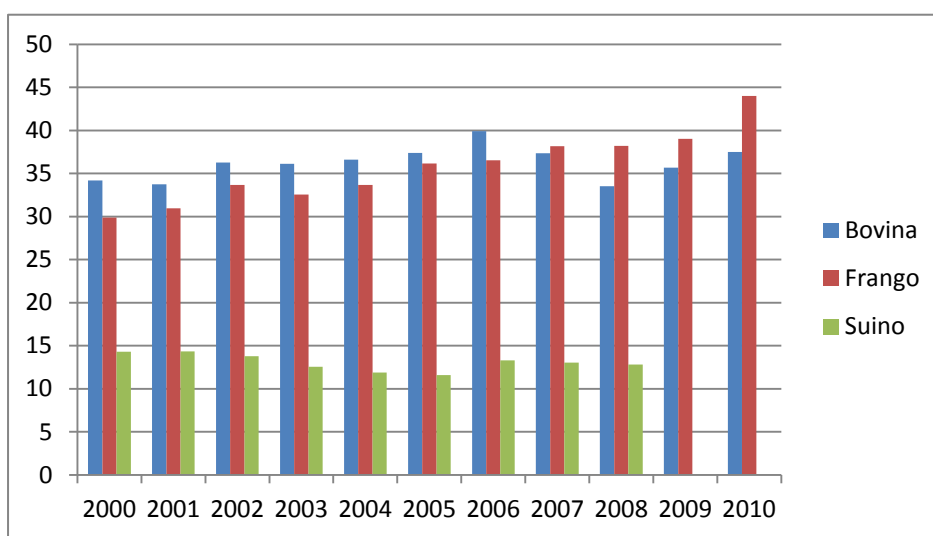


No que diz respeito à exportação de carne de frango, o país mantém a liderança mundial desde 2004, chegando em 2010 a 3,819 milhões de toneladas, embarcadas para mais de 150 países (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES E EXPORTADORES DE FRANGO, 2010).

Além de grande produtor e exportador, o Brasil apresentou um aumento no consumo per capita de carne de frango, atingindo cerca de 44 kg *per capita* em 2010. Esse aumento pode ser atribuído, principalmente a alguns fatores: (a) substituição da carne vermelha pela carne branca em função do menor custo e/ou a busca de uma alimentação mais saudável; (b) elevação da renda, melhorando o poder aquisitivo e por consequência o acesso à proteína animal. Além destes fatores, as inúmeras possibilidades culinárias da carne de frango, aliadas à rapidez no preparo, também podem ser consideradas importantes para o crescimento do consumo e preferência por parte dos brasileiros (ROPPE, 2008).

Como mostra a Figura 2, o consumo de proteína animal tem aumentado na última década, sendo que a carne de frango tem acompanhado esta evolução, chegando a ultrapassar o consumo de carne bovina em 2007. Devido a este forte crescimento, o consumo de carne de frango ultrapassou, pela primeira vez, o de carne bovina em 2007, tornando-se a carne mais consumida pelos brasileiros até hoje.

Figura 2: Evolução do consumo de carne no Brasil na última década (não foram encontrados dados para consumo de carne suína em 2009 e 2010).



Fonte: Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frango (ABEF); ROPPA, 2008.

A pressão do aumento de consumo resultou na necessidade de maior produção refletindo, em parte, nos dados apresentados na Figura 1.

1.2. Manejo

A criação de aves pode ser classificada em três formas de manejo: intensiva, extensiva e semi-intensiva (SARCINELLI, VENTURINI e SILVA, 2007).

A principal característica da forma extensiva é a criação dos animais em liberdade, podendo debicar e esgravatar em volta da casa à procura de comida, sem controle do que é ingerido.

Na forma semi-intensiva, as aves encontram-se restritas a um campo aberto, porém delimitado por uma cerca aramada. Além disso, neste espaço existe um pequeno galinheiro onde se pode manter as galinhas em local fechado durante a

noite. É um sistema mais complexo do que o extensivo, visto que permite ao criador fornecer praticamente toda comida e água. O número de aves por bando varia entre 50 e 200, considerado de criação de pequena escala.

Já o sistema intensivo é utilizado para criações que requerem maior investimento, tanto financeiro, como operacional (mão de obra). É, atualmente, o sistema de criação mais utilizado no Brasil e tem como principal característica o número elevado de aves, que pode chegar aos milhares (SARCINELLI, VENTURINI e SILVA, 2007), como ilustrado na Figura 3.

Figura 3: Sistema de produção intensiva de aves



Fonte: <http://www.mfrural.com.br/detalhes.asp?cdp=43574&nmoca=cama-de-frango-adubo-organico-de-granja>.

O sistema intensivo pra criação de aves, principalmente frango de corte, é resultado da confluência de avanços tecnológicos e estudos científicos sobre incubação artificial, controle de patologias e demanda nutricional aviário (SARCINELLI, VENTURINI e SILVA, 2007). Neste tipo de manejo as aves ficam confinadas em um galpão com piso de terra batida ou concreto, possibilitando o manejo de um grande número de aves por lote, porém gerando grande quantidade de resíduos, a chamada “cama-de-frango”.

A cama-de-frango é o material distribuído sobre o piso dos galpões e tem como principais objetivos: (a) servir de leito das aves; (b) absorver a umidade; (c) servir como isolante térmico; e (d) absorver o impacto do peso da ave (PAGANINI, 2004). O material utilizado como cama normalmente possui de 5 a 15 centímetros de espessura e pode ser composto de pó de serra, casca de arroz, sabugo de milho

triturado, palha das culturas em geral e fenos de gramíneas (ARAUJO, NETO e SUNDFELD, 2007).

Em diversos países, inclusive no Brasil, a cama é reutilizada de 3 a 5 gerações de aves, acumulando, restos de ração, penas e etc. A reutilização da cama de frango diminui custos para aquisição do material; em muitos casos, evita a escassez do material, disponibilidade de mão de obra para retirar a cama do galpão, e a disponibilidade de terrenos apropriados para espalhar estes nutrientes (OVIEDO-RONDÓN, 2008).

No Sistema Intensivo de criação aviária, os gastos com a nutrição das aves representam de 60 a 70% do total, pois esta é essencial para garantir a qualidade da carne e dos ovos (LIMA, 2005; CRUZ, 2001; VIEIRA, 2007). As rações devem ser compostas de milho e sorgo como fonte de carboidratos; óleos vegetais e gordura animal, para completo fornecimento de lipídios e proteína; farelo de soja, de algodão, de girassol e as farinhas de origem animal (NICOLETTI, 2005). Outros ingredientes podem ser adicionados com finalidade de fornecer aroma, cor, sabor e, principalmente, substâncias que previnem doenças e que estimulam o crescimento das aves, tais como os antimicrobianos (PALERMO, 2006). A proximidade de um grande número de aves e o alto potencial para a rápida disseminação de doenças fez necessário o uso rotineiro de medicamentos para manter a viabilidade das aves (AJIT K SARMAH 2006).

Porém, a adição indiscriminada de antimicrobianos na dieta das aves pode resultar no surgimento de bactérias resistentes, culminando na ineficácia de antimicrobianos no tratamento de infecções em humanos ou animais (ANUARIO DA AVICULTURA INDUSTRIAL BRASILEIRA, 2005). Como recentemente descoberto por pesquisadores franceses, o surgimento de uma cepa multirresistente da bactéria salmonela (*S. Kentucky*) ao antimicrobiano ciprofloxacina, que foi isolada a partir de galinhas e peru na Etiópia, Marrocos e Nigéria.(<http://www.crfsp.org.br/noticias/2775-salmonela-multirresistente.html>)

BARROW et al. (1998), observaram que o tratamento de galinhas com enrofloxacin, fez com que houvesse uma rápida mutação de uma população de *Escherichia coli* que passou de sensível a resistente.

Segundo CLAUS (1988) os mecanismos de resistência a antimicrobianos, podem envolver o DNA cromossomal, como a mutação, ser feito pela aquisição de material genético extracromossomal, (por transdução, transformação ou conjugação

de genes). A presença de antimicrobiano atua suprimindo os organismos suscetíveis e permitindo o crescimento dos mutantes resistentes aos fármacos (BARRETO *et al*, 2004)

Relata-se que o uso de antimicrobianos, na criação de animais, é mais frequente do que as indústrias revelam, sendo 40% superior ao estimado (CRESCER, 2001). Os antimicrobianos promotores de crescimento atuam no intestino e podem eliminar microrganismos produtores de toxinas, melhorando o aproveitamento dos alimentos. Especificamente em relação a frangos, alguns antimicrobianos, tais como, bacitracina, clortetraciclina, oxitetraciclina, penicilina, estreptomicina, eritromicina, oleandomicina, virginamicina, flavomicina e lincomicina podem favorecer um ganho de peso em torno de 10% (PADILHA, 2005). A grande maioria destes medicamentos não é absorvida pelo organismo, e assim, a cama de aviário pode apresentar resíduos destes antimicrobianos. O desconhecimento sobre os impactos destes no ambiente tornou-se motivo de grande preocupação. (HANH, 2004)

1.3. Problema Ambiental

A produção de cama de frango no Brasil, anualmente é estimada em 9,1 bilhões de quilos (SANTOS, 2002). Até 2001, esse subproduto da indústria avícola era amplamente utilizado na alimentação de ruminantes (LEME, ALLEONI e CAVAGUTI, 2000), porém, com a Instrução Normativa nº15 de 17 de julho de 2001, no seu 2º artigo (DOU de 18-07-01), proibindo a produção, comercialização e uso da cama aviária para tal finalidade, esta prática tornou-se ilegal. Segundo Hahn (2004), esta decisão foi tomada porque estes resíduos poderiam conter ingredientes de origem animal provenientes da ração desperdiçada pelos frangos, sendo possível que os bovinos, ao ingerirem este produto, passassem a ser portadores da doença BSE (encefalopatia espongiforme bovina), comumente conhecida como “síndrome da vaca louca”.

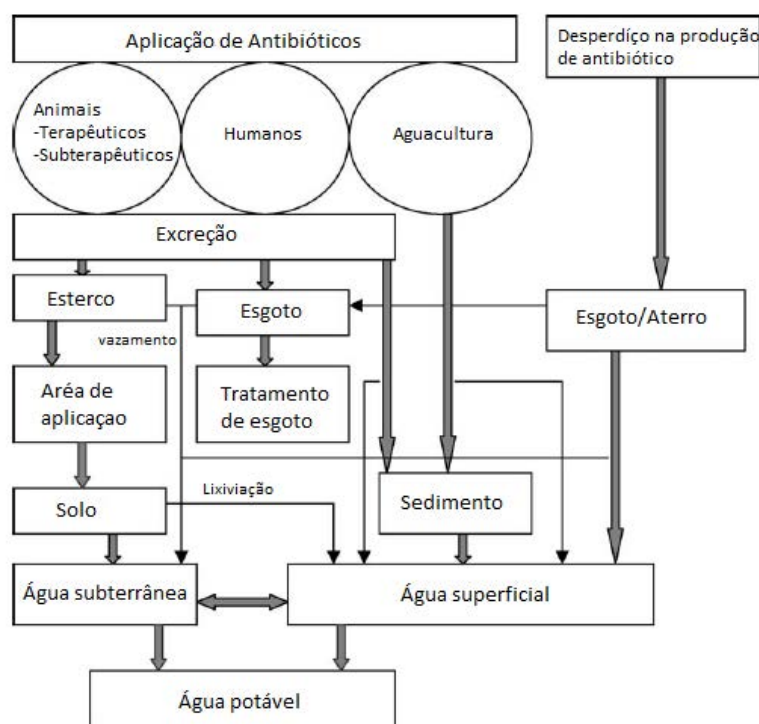
Porém essa proibição, criou uma questão: onde e como armazenar a cama de frango que não será mais utilizada como alimento para ruminantes? Uma das medidas encontradas pelos produtores de aves foi de intensificar a utilização como adubo orgânico em lavouras. Entretanto, o problema passou a ter um caráter ambientalista, fato preocupante, pois os compostos presentes nessa matriz, em especial destaque os antimicrobianos, podem prejudicar a qualidade do solo bem

como influenciar na potabilidade dos recursos hídricos e, conseqüentemente, a atingir o homem (GONZALES *et al.*, 2005).

Estudos revelaram que no Reino Unido foram encontrados os antimicrobianos ciprofloxacina, lincomicina e trimetropina em água superficial e em solo adubado com cama de frango (BOXAL *et al.*, 2005); ciprofloxacina, norfloxacina, danofloxacina e enrofloxacina foram encontrados em cama de frango na China (ZHAO *et al.*, 2010) e na Turquia foi encontrado enrofloxacina em cama de frango e solo (KARCI e BALCIOGLU, 2009).

Embora a literatura esteja repleta de informações publicadas sobre a mobilidade dos pesticidas, bem como compostos inorgânicos no ambiente há uma escassez de dados sobre as características de transporte dos medicamentos veterinários. Portanto, a Figura 4 resume um possível percurso dos antimicrobianos desde a sua produção até o seu descarte e posterior consumo animal e humano

Figura 4 : Possíveis rotas de propagação de antimicrobianos no meio ambiente.



Fonte: Adaptado de KUMAR *et al.* (2005)

1.4. Escolha dos antimicrobianos que serão estudados

Para a escolha dos antimicrobianos que serão estudados neste projeto foi necessário o conhecimento dos principais antimicrobianos comercializados e utilizados na criação de frangos de corte no Brasil. Por tanto, utilizou-se o relatório da Secretaria de Saúde do Estado do Paraná que, através do Programa Estadual de Controle de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMvet-PR), realizou um levantamento que apontou quais as principais classes eram utilizados na criação de frango de corte tanto para fins terapêuticos como preventivos (SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO PARANÁ, 2010).

Nesse levantamento, as classes de antimicrobianos para fins preventivos mais citados foram: fluoroquinolonas (34 %), ionóforos (20 %), macrolídeos (10 %), quinolonas e tetraciclina (6 %), sulfonamidas (4 %) e lincosamidas (3 %); e, para fins terapêuticos foram: ionóforos (25 %), fluoroquinolonas (19 %), sulfonamidas (14 %), tetraciclina (11 %), β -lactâmicos (7 %), macrolídeos (5 %) e aminoglicosídeos (4 %).

Segundo esse levantamento, a classe de antimicrobianos mais utilizada é a fluoroquinolona, portanto, esta foi escolhida para ser investigada no presente estudo. Porém, essa classe compreende vários compostos como: ciprofloxacina, norfloxacina, enrofloxacina e danofloxacina. No mesmo relatório foi realizado um levantamento de quais fluoroquinolonas foram mais citadas: enrofloxacina (39 citações); norfloxacina (21 citações); ciprofloxacina (12 citações). A danofloxacina não foi citada, portanto, as substâncias escolhidas nesta monografia foram a ciprofloxacina, norfloxacina e enrofloxacina.

Outro critério para a escolha dos antimicrobianos a serem estudados nesse trabalho foi o potencial de contaminação de água superficial destes compostos. Esse estudo foi realizado por um doutorando do grupo, que avaliou o potencial de contaminação de água superficial das três fluoroquinolonas, utilizando o método de Goss, que leva em conta a meia-vida do composto no solo ($t_{1/2}$), solubilidade em água (S) e a constante de adsorção à matéria orgânica do solo (K_{oc}) (GOSS, 1992). Ciprofloxacina, norfloxacina e enrofloxacina apresentaram de médio para alto potencial de contaminação de água superficial.

1.5. Informações gerais dos antimicrobianos estudados

O ácido nalidixico foi a primeira quinolona a ser descoberta, surgiu acidentalmente como produto secundário da síntese da cloroquina, é denominado de quinolona de primeira geração (ANDRIOLE, 2000; HIGGINS et al., 2003).

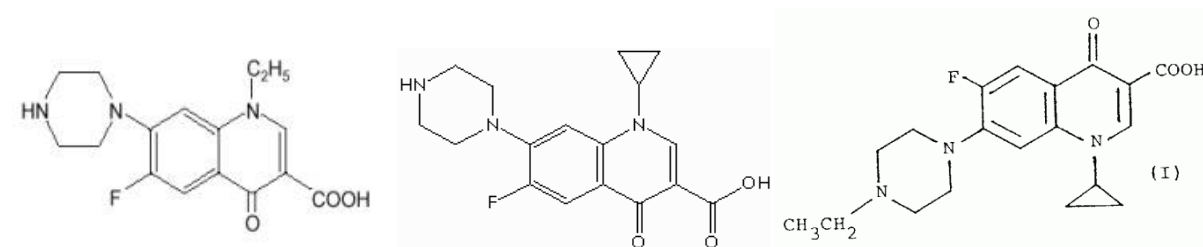
Na década de 1980 a partir de diversas pesquisas surgiram as chamadas quinolonas de segunda geração, as fluoroquinolonas, que diferem quimicamente das quinolonas por possuírem a combinação de um átomo de flúor e um grupo piperazinil, os principais representantes desse grupo são ciprofloxacina, norfloxacina e enrofloxacin. (APPELBAUM; HUNTER, 2000).

A ciprofloxacina, norfloxacina e enrofloxacin pertencem à classe das Fluoroquinolonas, possuem ampla aplicação clínica humana e veterinária. Estes antimicrobianos têm efeito bactericida e todos atuam por inibição da DNA girase e da Topoisomerase IV que são responsáveis pelo controle do processo de divisão, reunião de novas cadeias e enovelamento do novo DNA durante a replicação. São indicados para os seguintes tratamentos em humanos:

1. Infecções do sistema urinário;
2. Infecções dérmicas;
3. Tratamento de doenças sexualmente transmissíveis, como a gonorréia uretral e cervical causadas pelo *N. gonorrhoeae*;
4. Pneumonia causada por bacilos.

A Figura 5 ilustra a estrutura química dos antimicrobianos estudados nessa monografia, bem como massa molar e algumas propriedades físicas e químicas.

Figura 5: Fórmula estrutural dos antimicrobianos.



A introdução de um átomo de flúor e do grupo piperazinil levou a um maior espectro de ação, aumentando a capacidade das quinolonas penetrarem na parede bacteriana e levando a uma atividade antibacteriana de até 1000 vezes superior ao ácido nalidixico (SOUSA, 2007).

A presença de grupo ácido (ácido carboxílico) e de um grupo básico (amina terciária) atribuiu aos fármacos propriedade anfotérea podendo estar presente em mais do que uma espécie em solução (dependendo do pH), além de influenciar o comportamento farmacológico, uma vez que a presença desses grupos carregados é necessária para atividade biológica (PARK et al, 2002).

1.6. Ocorrência dos antimicrobianos selecionados.

Apesar do Brasil apresentar diversos estudos de caráter ambiental, não foi encontrado estudos na literatura para ciprofloxacina, norfloxacina e enrofloxacin em cama de frango, solo, água (superficiais e/ou subterrâneas) e outras matrizes, porém, o Quadro 1, apresenta dados da literatura da ocorrência desses antimicrobianos em outros países.

Quadro 1: Ocorrência dos antimicrobianos que foram estudados em diversos países.

Antibiótico	País	Matriz	Referência
CIP e NOR	China	Cama de Frango	ZHAO et al., 2010
CIP	Alemanha	Água superficial	CHRISTIAN et al., 2003
CIP	Turquia	Cama de Frango e Solo	KARCI e BALCIOGLU , 2009
CIP	Turquia	Solo	USLU et al., 2007
CIP e ENR	Àustria	Cama de Frango e Solo	CARBALLO et al., 2006
NOR	Tailândia	Solo	BOONSANER e HAWKER, 2009
CIP e NOR	Suécia	Esgoto	LINDBERG et al., 2003

CIP=ciprofloxacina;NOR=norfloxacina;ENR=enrofloxacin.

O Quadro 1 mostra que os antimicrobianos ciprofloxacina, norfloxacina e enrofloxacin utilizados na avicultura estão presentes em cama de frango, água superficial, solo e esgoto em diversas localidades do mundo, evidenciando a importância de se avaliar a presença desses no Brasil.

1.7. Métodos analíticos para determinação de fluoroquinolonas em matrizes de cama de frango, solo e água superficial.

O objetivo da revisão bibliográfica foi avaliar o cenário atual referente aos métodos utilizados para análise de resíduos de antimicrobianos da classe das fluoroquinolonas em diferentes tipos de matrizes. Entre elas, foi merecido especial destaque a cama de frango, objetivo de estudo do presente trabalho (Quadro 2).

Quadro 2: Métodos encontrados na literatura para análise de resíduos de fluoroquinolonas em cama de frango, solo e água superficial.

Antibiótico	País	Matriz	Tratamento da amostra	Sistema Cromatográfico	LD/LQ	Porcentagem de recuperação	Referência
Ciprofloxacina e Norfloxacina	China	Cama de frango	-1,0g de amostra - Adição de Hac:ACN (3:97) na amostra e homogeneização utilizando vortex; -Ultrassom por 30min; - Centrifugação por 10 min a 4000 rpm; -Filtração do sobrenadante e análise do sobrenadante por HPLC-FLU.	-HPLC-FLU -Coluna: Gemini C18, 150 mm; -Temperatura do forno: 40° C; -Fase Movel:ACN:0,05% H_3PO_4 ; -Modo: Gradiente; -Volume de injeção: 2 μ l; -Taxa de fluxo: 1ml min ⁻¹ .	LQ _{cip} = 0,155 mg L ⁻¹ LD _{cip} = 0,046 mg L ⁻¹ LQ _{nor} =0,184 mg L ⁻¹ LD _{nor} =0,055 mg L ⁻¹	73,9%-102%	ZHAO et al., 2010
Ciprofloxacina	Alemanha	Água superficial	- SPE: Oasis HLB conectado em serie com SDB, eluição com metanol (HLB) e com metanol: acido fórmico (SDB); -Os extratos foram combinados e secados em banho-maria; -Redissolução com 0,5 ml de Água: ACN(95:5 v/v).	-HPLC-MS/MS; -Coluna C18; -ionização por eletronspray no modo íon positivo; -Fase móvel: NE	LQ= 5 ng L ⁻¹	92%	CHRISTIAN et al., 2003
Ciprofloxacina	Turquia	Cama de frango e Solo	-1 g de solo; -Adição de uma solução aquosa de Mg(NO ₃) ₂ (29% m/v); -Homogeneização no vórtice por 30s com posterior banho de ultrassom (30 min) -Centrifugação a 7000 rpm por 10 min; -Filtração do sobrenadante para posterior análise.	-HPLC-FLU/DAD; -Coluna: ODS-AQ -Temperatura do forno: 26° C; -Fase móvel: 0,1% de ácido fórmico em ACN(A) e 0,1% de ácido fórmico em água(B); Modo: Gradiente; -Volume de injeção: 20 μ l; -Taxa de fluxo de 0,7ml min ⁻¹ .	Não encontrado	24 a 42%	KARCI e BALCIOGLU, 2009

ACN=acetonitrila; Hac=ácido acético; HPLC=cromatografia líquida de alta eficiência; MS=espectrometria de massa; FLU=fluorescência; DAD=detector de arranjo de diodo; cip= ciprofloxacina; nor= norfloxacina; enr=enrofloxacin; LQ=limite de quantificação; LD= limite de detecção.

Quadro 2: Continuação

Ciprofloxacina e Enrofloxacina	Turquia	Solo	-1g de solo -Adição de Na₂EDTA.2H₂O, KH₂PO₄, H₃PO₄ e ACN, homogeneização utilizando um vortice; -Ultrassom por 15 min; -Centrifugação da mistura por 5 min; - Sobrenadante diluído para 200ml; - SPE: SAX e Oasis HLB conectados em série, eluição com amônia e metanol; -Secagem do eluato sob fluxo de nitrogênio até 150µl.	-HPLC-FLU -Coluna: Luna C18, 150mm; -Temperatura do forno: 30° C; -Fase móvel: H₃PO₄:ACN(80:20); -Modo: Isocrático; -Volume de injeção: 10µl; -Taxa de fluxo: 0,8ml min⁻¹.	Não encontrado	61% a 89%	USLU et al., 2007
Ciprofloxacina e Enrofloxacina	Áustria	Cama de frango e Solo	-1,0g da amostra; - Banho de ultrassom por 20 min; -Filtração do extrato; -Cleanup: 2x com 20 ml de n-hexano; -Secagem do filtrado sob fluxo de nitrogênio para 1 ml; -Cleanup: 4x com 20 ml de n-hexano; -Mudança de solvente para ACN:Água (10:90);	-HPLC-MS/MS -Modo de operação: íon positivo; -Coluna: Luna C8; -Fase móvel: 0,01% de ácido fórmico em água(A); 0,01 de ácido fórmico em ACN em gradiente.	LD _{cip} = 4,9 ng ml ⁻¹ LQ _{cip} = 18 ng ml ⁻¹ LD _{enr} =4,5 ng ml ⁻¹ LQ _{enr} =16 ng ml ⁻¹	61% a 105%	CARBALLO et al., 2006
Norfloxacina	Tailândia	Solo	-5g de solo; -Adição de tampão McIlvaine-EDTA ; - Ultrassom e filtração; - SPE: StrataX, Eluição com 2ml de solução 0,01M de ácido oxálico.	-HPLC-DAD -Coluna C18 (25° C) -Fase móvel: ACN: Ácido oxálico(95:5%); - Modo: Isocrático; -Taxa de fluxo: 1ml min⁻¹.	LD=0,8 mg kg ⁻¹ LQ=1,6 mg kg ⁻¹	68%	BOONSANER e HAWKER, 2009

ACN=acetonitrila; Hac=ácido acético; HPLC=cromatografia líquida de alta eficiência, MS=espectrometria de massa; FLU=fluorescência; DAD=detector de arranjo de diodo; cip= ciprofloxacina; nor= norfloxacina; enr=enrofloxacina; LQ=limite de quantificação; LD= limite de detecção.

O Quadro 2 apresenta vários métodos para análise de fluoroquinolonas em diversas matrizes; são geralmente procedimentos longos, que envolvem várias etapas de extração e purificação com diversos tipos de adsorventes (StrataX, Oasis HLB, Sax), além de uma etapa de *cleanup*.

Zhao *et al.* (2010) desenvolveram um método simples e rápido para determinação de ciprofloxacina e norfloxacina em cama de aviário. O procedimento baseia-se na extração sólido-líquido com 3 mL de acetonitrila:ácido acético (97:03, v/v), sendo esta mistura agitada em *vortex* por alguns minutos, seguida de banho de ultrassom por mais 30 minutos e centrifugação para separação do sobrenadante. O precipitado passou pelo mesmo procedimento por mais duas vezes. Os sobrenadantes foram reunidos, ajustados para 10 mL com acetonitrila:ácido acético (97:03, v/v), filtrados em membranas (0,22 μm), sendo 20 μL analisados por CLAE-FLU. Foram obtidos bons resultados de recuperação, com valores entre 74 e 102%, além de baixos limites de quantificação (155 $\mu\text{g L}^{-1}$ para ciprofloxacina e 184 $\mu\text{g L}^{-1}$ para norfloxacina). Uma característica importante foi a não utilização da etapa de *cleanup*, o que o tornou mais rápido que os demais listados no Quadro 2. Dessa forma, este procedimento foi investigado no presente estudo, inserindo mais um antimicrobiano: a enrofloxacin, que não foi avaliada por Zhao *et al.* (2010), buscando também limites de quantificação mais baixos.

Karci e Balcioglu (2009) desenvolveram um método para determinação de ciprofloxacina em solo. O procedimento baseia-se na extração sólido-líquido, com adição de uma solução de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ (29% v/v), homogeneização utilizando um vórtice por 30 segundos, seguida de banho de ultrassom por 30 minutos e centrifugação por 10 minutos, o sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,22 μm , para posterior análise em CLAE-FLU. Foram obtidos baixos resultados de recuperação, com valores de 24 a 42 %.

Carballo *et al.*, (2006) propuseram um método de extração de ciprofloxacina e enrofloxacin em cama de aviário. O procedimento baseia-se na extração sólido-líquido, posterior banho de ultrassom por 20 minutos, duas etapas de *cleanup* com n-hexano, secagem do solvente para 1 mL, e mudança de solvente para acetonitrila:água (90:10) e posterior análise do extrato em CLAE-MS/MS. Bons resultados de recuperação foram obtidos, com valores de 61 a 105%, e limites de quantificação de 18 ng L^{-1} para ciprofloxacina e 4,5 ng L^{-1} para enrofloxacin. Uma característica importante desse método é a etapa de *cleanup*, que não foi utilizada

por outro autor, provavelmente essa etapa foi introduzida para a limpeza de interferentes da amostra.

Quanto às técnicas cromatográficas de análise, o Quadro 2 mostra que a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (CLAE-FLU), e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-MS) são amplamente utilizadas para a determinação qualitativa e quantitativa de fluoroquinolonas. Os compostos estudados são fluorescentes, apresentando boa detecção e seletividade em sistemas CLAE-FLU, o sistema CLAE-MS também apresenta baixos limites de detecção e boa seletividade para os compostos analisados, porém trata-se de uma técnica mais cara e com mais variáveis para otimização quando comparada com CLAE-FLU.

2. Objetivos

Considerando-se a grande produção avícola do Brasil e a consequente produção de cama-de-frango, cujo destino atual mais empregado é a disposição no solo, quer seja como etapa intermediária de destinação ou como aditivo orgânico em culturas vegetais. Considerando-se o uso intenso e, muitas vezes, indiscriminado de antimicrobianos no manejo da criação de aves e que no Brasil são poucos os dados sobre a ocorrência e dispersão de antimicrobianos no ambiente, este trabalho teve como objetivo geral contribuir para o diagnóstico da contaminação de recursos hídricos por antimicrobianos que o uso da cama de frango pode ocasionar. Como objetivo específico destaca-se:

- Otimização e validação de método para análise de fluoroquinolonas (enrofloxacin, ciprofloxacin e norfloxacin) em cama de frango.

3. Materiais e Métodos

3.1. Materiais

3.1.1. Padrões analíticos dos antimicrobianos e solventes

Os padrões dos antimicrobianos ciprofloxacina (99,6%), norfloxacina (99,8%) foram adquiridos do laboratório Sigma-Aldrich, enquanto a enrofloxacin (99,0%) foi adquirido do laboratório Dr Ehrenstofer GmbH (Alemanha).

Os solventes utilizados foram acetonitrila (grau HPLC, JTBaker), ácido acético (grau HPLC, JTBaker), água deionizada (Milli-Q), ácido fosfórico (85%, JTBaker) e metanol (grau HPLC, JTBaker).

3.1.2. Vidraria e equipamentos

Foi utilizada vidraria comum de laboratório (proveta, micropipeta, béquer, balão, proveta e etc).

Os equipamentos utilizados foram:

- Balança analítica com precisão de 0,01 mg, Mettler Toledo, modelo AG 245;
- Ultrasson Thornton - T50220, 20 L, 40 Hz;
- Agitador de tubos (Vortex) Phoenix- AP56;
- HPLC-Varian 920-LC; acoplado com detector de fluorescência e com injetor automático;
- Coluna Phenomenex-Gemini C18, 110A 150 x 4,6mm, 5µm;
- Estufa Fanem, modelo 315 SE.
- Origin 7.0

3.2. Métodos

3.2.1. Limpeza da vidraria

O material utilizado foi lavado com solução de Extran 2% (MA-02-neutro, Merck) e após 24 horas foi enxaguado em água corrente. A secagem da vidraria foi realizada em estufa à 130°C, sendo o material volumétrico seco à temperatura ambiente.

3.2.2. Condições cromatográficas

As condições cromatográficas utilizadas nesse trabalho foram otimizadas baseando-se no trabalho de Uslu *et al.* (2007) O Quadro 3 mostra as condições cromatográficas otimizadas neste trabalho.

Quadro 3: condições cromatográficas para análise dos três antimicrobianos por HPLC-FLU

Equipamento	HPLC-Varian 920-LC
Detector	Fluorescência
Comprimento de onda	Ex=280 nm, Em=480 nm
Fase móvel	83:17 (v/v) (0,02 M H ₃ PO ₄ :ACN)
Modo de eluição	Isocrático
Vazão	1 mL min ⁻¹
Coluna	C18, 110 Å, 150 x 4,6 mm, 5µm (Phenomenex-Gemini)
Volume de injeção	20 µL
Temperatura da coluna	30°C

3.2.3. Preparo das soluções dos padrões

As soluções estoques de norfloxacin e enrofloxacin foram preparadas em metanol e ciprofloxacina em metanol:água (60:40, v/v) na concentração de 100 mg L⁻¹. A partir desta, foram preparadas soluções intermediárias na concentração de 10 mg L⁻¹. As soluções mistas dos antimicrobianos (ciprofloxacina, norfloxacin e enrofloxacin) foram preparadas por diluição com água deionizada das soluções intermediárias na concentração de 2 mg L⁻¹. As soluções de trabalho, utilizadas para

a construção das curvas analíticas foram preparadas a partir das soluções mistas. As soluções estoque e intermediária foram armazenadas em frascos âmbar, vedadas com *parafilm* e mantidas a -18°C por um período de 3 meses.

3.2.4. Construção das curvas analíticas e determinação da linearidade do detector (Varian 920-LC/FLU)

Nove soluções de padrões mistos dos antimicrobianos (ciprofloxacina, norfloxacin e enrofloxacin) com concentrações entre 10 e 170 $\mu\text{g L}^{-1}$ foram injetadas no sistema Varian 920-LC/FLU. Gráficos para avaliar a linearidade foram construídos para cada composto utilizando o teste de Huber, relacionando-se o valor de concentração da solução no eixo das abcissas com a área do pico cromatográfico, correspondente ao sinal do detector de fluorescência, dividida pela respectiva concentração daquela área, no eixo das ordenadas (VALENTE, AUGUSTO, RIEDO, 2009).

As curvas analíticas foram construídas utilizando pelo menos cinco soluções diferentes para cada antimicrobiano, respeitando a linearidade da resposta do detector obtida pelo teste de Huber previamente. As injeções foram realizadas em ordem crescente de concentração.

Os antimicrobianos foram identificados segundo o tempo de retenção obtido pela análise da solução de cada padrão injetada individualmente.

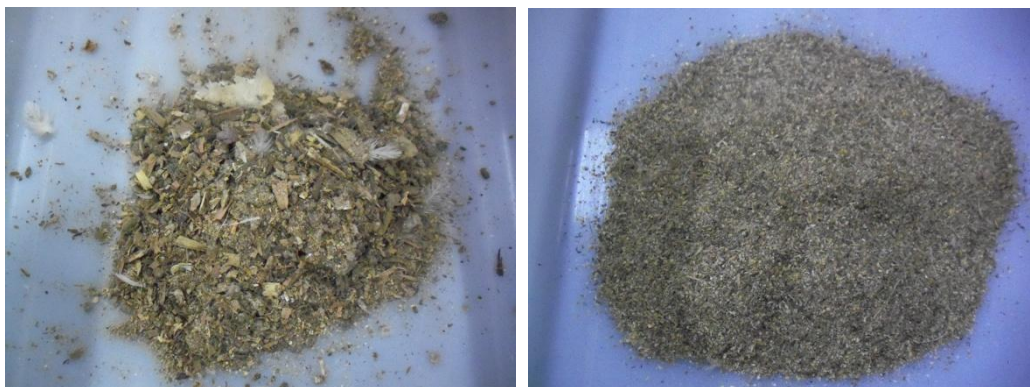
3.2.5. Determinação dos limites de detecção e de quantificação equipamento (Varian 920-LC/FLU)

O limite de quantificação do equipamento foi considerado como a menor concentração da solução padrão dos antimicrobianos preparada em solvente, situada dentro da região linear e o limite de detecção foi obtido pelo método visual que consiste em determinar a menor de concentração do analito, também preparado em solvente, de modo que se possa distinguir entre ruído e sinal analítico (RIBANI *et al.*, 2004).

3.2.6. Preparo inicial das amostras de cama de frango

As amostras de cama de frango foram coletadas em uma granja em Bueno de Andrade – Distrito do município de Araraquara-SP(cama de frango comercial) e na UNESP Jaboticabal (cama orgânica), transportadas em caixas térmicas até o Instituto de Química da UNESP e armazenadas em freezer à -20°C. Em seguida, foram liofilizadas e tamizadas para melhor homogeneidade e novamente levadas ao freezer (-20°C). A Figura 6 ilustra o aspecto das amostras antes e após a homogeneização.

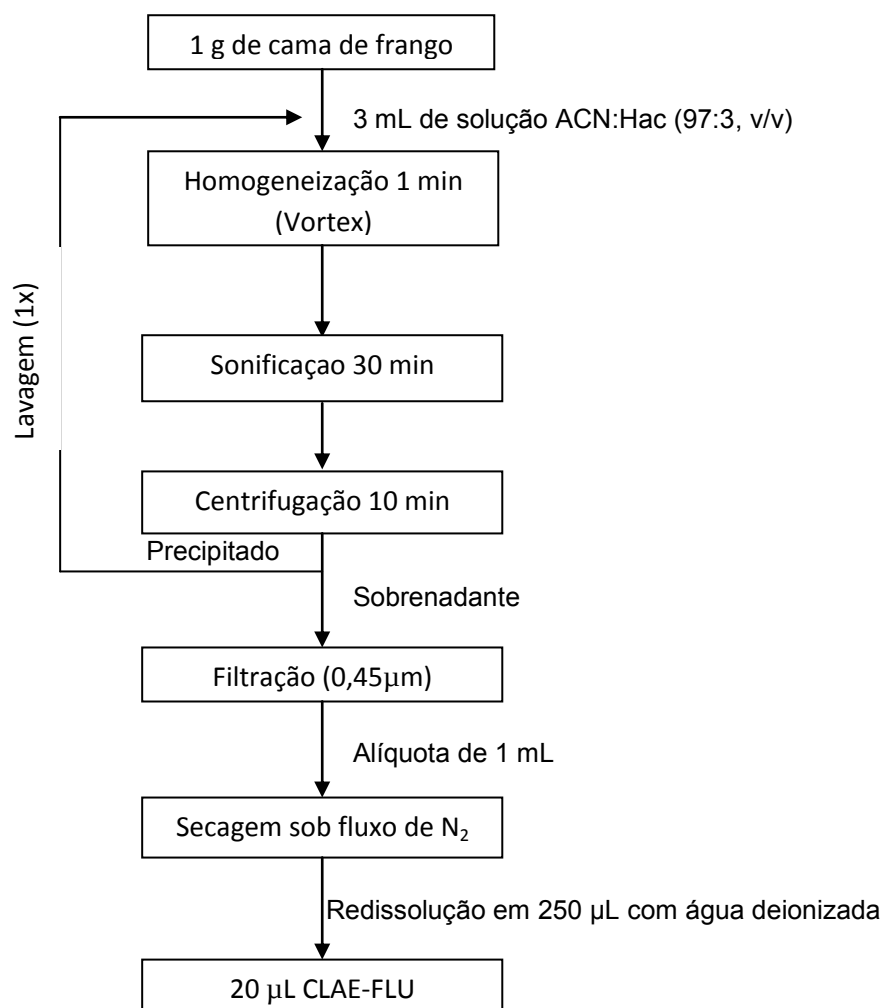
Figura 6: amostras de cama de frango antes (esquerda) e após (direita) a homogeneização.



3.2.7. Otimização do método de extração proposto para análise dos antimicrobianos ciprofloxacina, norfloxacin e enrofloxacin em cama de frango.

Trata-se de um método de extração de ciprofloxacina, norfloxacin e enrofloxacin baseado no trabalho de Zhao *et al.* (2010), que também englobou matriz de cama de frango. O procedimento está descrito na Figura 7

Figura 7: Fluxograma do procedimento de extração proposto para determinação de antimicrobianos desse estudo em cama de frango.



3.2.8. Avaliação do método proposto (estudo de recuperação)

A validação do método analítico é realizada, usualmente, por meio de ensaios de recuperação, uma vez que esse procedimento gera informações necessárias para avaliação do procedimento como exatidão e precisão. A exatidão expressa a concordância entre o valor encontrado e o valor aceito como verdadeiro e a precisão é o parâmetro que avalia a proximidade entre varias medidas efetuadas em uma mesma amostra (LANÇAS, 2004).

Esses itens foram determinados utilizando os valores de porcentagem de recuperação e do coeficiente de variação do método. Para o estudo de recuperação, as amostras foram fortificadas com soluções em mistura dos compostos norfloxacin, ciprofloxacina e enrofloxacin na concentração de 100 ng g⁻¹ e em triplicata. O tempo de contato entre a matriz e as soluções de antimicrobianos foi de 4 horas.

3.2.9. Avaliação do efeito matriz

O efeito matriz foi avaliado comparando o coeficiente angular da curva analítica preparada na matriz com o coeficiente angular da curva analítica preparada no solvente. O cálculo para avaliar esse efeito foi efetuado utilizando a equação abaixo:

$$\% \text{ efeito de matriz} = \frac{X_1 - X_2}{X_2} * 100$$

Sendo:

- X₁ o coeficiente angular da curva analítica preparada na matriz;
- X₂ o coeficiente angular da curva analítica preparada no solvente

Dessa forma é verificado se a matriz exerce efeito positivo (aumento de sensibilidade) ou negativo (decréscimo de sensibilidade). Quando o resultado for acima de 10%, considera-se que existe o efeito de matriz, podendo assim influenciar nos resultados analíticos quantitativos da amostra.

3.2.10. Análise das amostras por LC-MS/MS

A identificação dos antimicrobianos norfloxacin, ciprofloxacina e enrofloxacin foram realizadas utilizando um sistema LC-ESI-MS/MS-QTrap, por experimentos de IDA (informação dependente da aquisição), que consiste do monitoramento de reações múltiplas (MRM), e por melhoramento do produto iônico (EPI – *enhanced product ion*). Os dois métodos foram desenvolvidos com o objetivo de realizar a identificação inequívoca dos analitos.

Os analitos foram separados por uma coluna ReproSil-Pur ODS-3 (5 μm , 150 x 4,6 mm; Maisch, Ammerbuch, Alemanha), utilizando um amostrador automático Agilent 1100 e um 1200 HPLC Agilent e bomba (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha). Eluição em modo isocrático com água (solvente A) e metanol (solvente B) com as seguintes condições aplicadas: 75% B e 25% A por 12 minutos com vazão de 50 $\mu\text{L min}^{-1}$. Os experimentos IDA foram realizados em um *ion trap* linear em um espectrômetro de massa (QTRAP, Applied Biosystems, Darmstadt, Alemanha) equipado com uma fonte Turbo Ion Spray (4,0 kV) no modo de ionização positivo, conectado ao sistema de HPLC para registro de dados espectrais.

Foi aplicado para todos os experimentos o DP (*Declustering Potencial*) foi definido como 41 V, sendo usado N_2 como gás de colisão. O modo MRM utilizou transições apresentadas na Tabela 1. A ER (*enhanced resolution*) foi realizada com uma taxa de varredura de 250 uma s^{-1} . Para o modo EPI, trabalhou-se com uma taxa de *scan* de 4000 uma s^{-1} , uma energia de colisão de 30 V, e um tempo de preenchimento do *ion trap* linear de 300 ms. Para todos os experimentos o IDA foi realizado na faixa de 100 a 400 m/z com potencial de entrada de 8 V o que permitiu o Q0-trapping.

Tabela 1: Parâmetros otimizados para cada analito.

Transições MS/MS - modo MRM e parâmetros otimizados para cada antimicrobiano				
Q1 Mass (Da)	Q3 Mass (Da)	Param	ID	
320	302	200	EP	Norfloxacina 1
		CEP	20	
		CE	23	
Q1 Mass (Da)	Q3 Mass (Da)	Param	ID	
320	276	200	EP	Norfloxacina 2
		CEP	20	
		CE	23	
Q1 Mass (Da)	Q3 Mass (Da)	Param	ID	
332	314	100	EP	Ciprofloxacina 1
		CEP	22	
		CE	23	
Q1 Mass (Da)	Q3 Mass (Da)	Param	ID	
332	231	100	EP	Ciprofloxacina 2
		CEP	22	
		CE	47	
Q1 Mass (Da)	Q3 Mass (Da)	Param	ID	
360	316	200	EP	Enrofloxacina 1
		CEP	24	
		CE	27	
Q1 Mass (Da)	Q3 Mass (Da)	Param	ID	
360	342	200	EP	Enrofloxacina 2
		CEP	24	
		CE	27	

4. Resultados e Discussões

4.1 . Condições Cromatográficas

A primeira etapa do estudo baseou-se no desenvolvimento de um método cromatográfico para separação dos antimicrobianos selecionados (norfloxacin, ciprofloxacina e enrofloxacin). A otimização das condições de análise no LC-Varian 920 foi baseada no trabalho de Uslu *et al.* (2007), que apresenta compostos em comum a este estudo.

Os testes preliminares basearam-se na separação apenas da norfloxacin e ciprofloxacina, antimicrobianos de estrutura molecular muito semelhante e, provavelmente, de difícil separação. Após obter boa resolução destes, a enrofloxacin foi introduzida na mistura.

A parte mais difícil desta etapa do trabalho foi estabelecer a fase móvel adequada. Nesse sentido foram realizadas diversas combinações de solventes, utilizando basicamente ácido acético, ácido fosfórico e acetonitrila em diversas proporções, sempre no modo isocrático. Alguns desses testes estão apresentados no Quadro 4.

Quadro 4: Proporções dos solventes avaliadas para compor a fase móvel.

	Teste 1	Teste 2	Teste 3	Teste 4
Solventes	0,1% Hac:ACN	0,02M H ₃ PO ₄ :ACN	0,02M H ₃ PO ₄ :ACN	0,02M H ₃ PO ₄ :ACN
Proporção (v:v)	80:20	80:20	81:19	82:18

Hac=ácido acético; ACN=acetonitrila

4.1.2. Método proposto

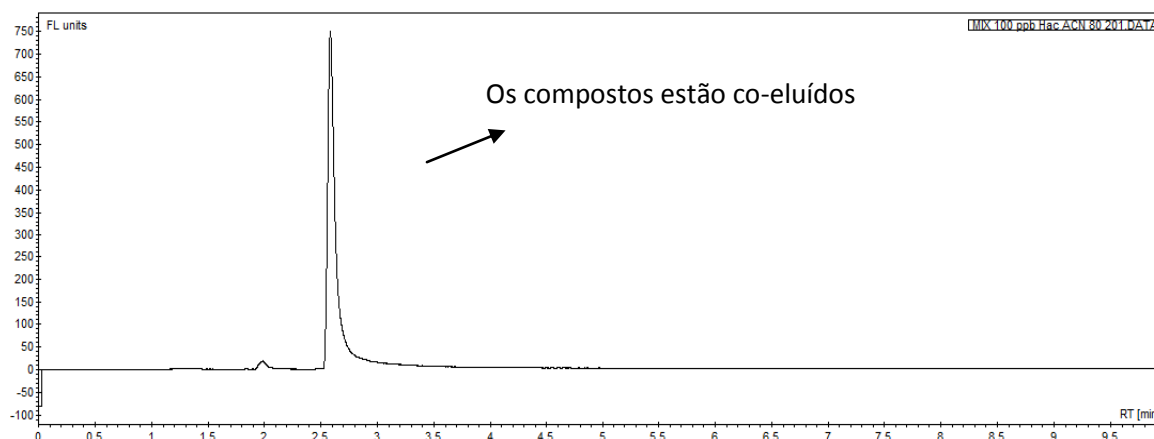
Analisando os cromatogramas dos testes preliminares, concluiu-se que o melhor método para a separação dos três antimicrobianos foi o de proporção de fase móvel 83:17 (v/v), como detalhado no Quadro 3.

Os itens abaixo apresentam os resultados dos testes do Quadro 4.

Teste 1

Observou-se que o ácido acético, provavelmente, não foi eficiente para suprimir os hidrogênios ácidos dos analitos, portanto, os compostos poderiam estar na forma ionizada, diminuindo a interação com fase estacionária (C18), prejudicando a separação (Figura 8).

Figura 8: Cromatograma referente ao teste 1 (0,1% Hac:ACN; 80:20, v/v) dos antimicrobianos, norfloxacin e ciprofloxacina à 100 $\mu\text{g L}^{-1}$.

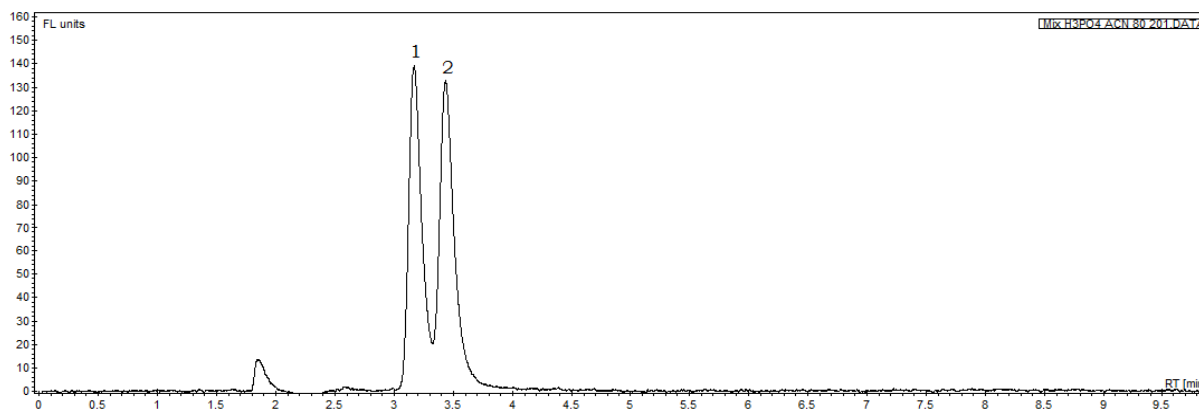


Portanto, trocou-se a solução de 0,1% de ácido acético por uma de 0,02M de ácido fosfórico, que apresenta caráter em pH mais baixo (Teste 2).

Teste 2

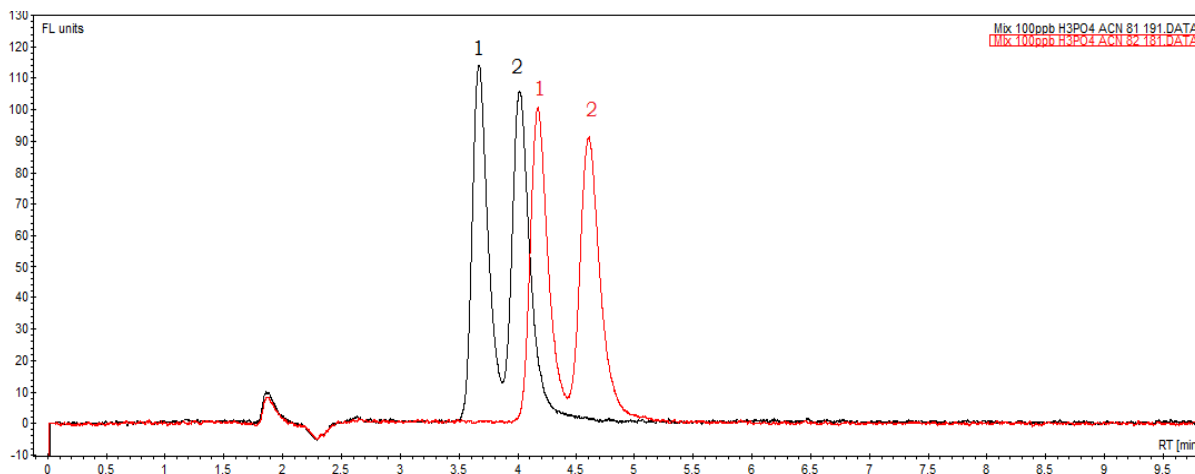
A substituição do ácido acético 0,1% por ácido fosfórico 0,02 M proporcionou uma melhor separação como observado na Figura 9

Figura 9: Cromatograma referente ao teste 2 (0,02 M H_3PO_4 :ACN; 81:20, v/v). (1) norfloxacin e (2) ciprofloxacina, ambos à 100 $\mu\text{g L}^{-1}$.



Com pH 3, utilizando ácido fosfórico 0,02 M foi possível suprimir a ionização dos hidrogênios ácidos dos analitos, proporcionando uma melhor separação dos antimicrobianos. Entretanto, a resolução entre os picos ainda não é considerada adequada para quantificação, portanto, como fase subsequente do estudo, analisou-se a fase móvel contendo ácido fosfórico 0,02 M e acetonitrila em diferentes proporções, cujos cromatogramas estão apresentados na Figura 10 (testes 3 e 4).

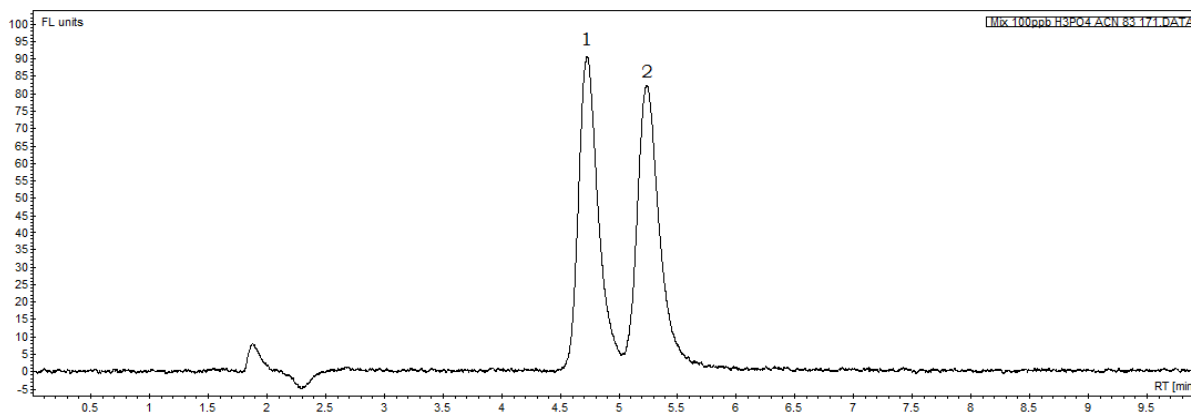
Figura 10: Cromatogramas referente aos testes 3 (0,02 M H₃PO₄:ACN; 81:19, v/v), representado na cor preta e 4 (0,02 M H₃PO₄:ACN; 82:18, v/v) em vermelho. (1) norfloxacin e (2) ciprofloxacina, ambos à 100 µg L⁻¹.



Observou-se que diminuindo a força de eluição da fase móvel, ou seja, aumentando a concentração de acetonitrila, houve um aumento mais efetivo na interação dos analitos com a fase estacionária, suficiente para uma melhor separação entre os picos.

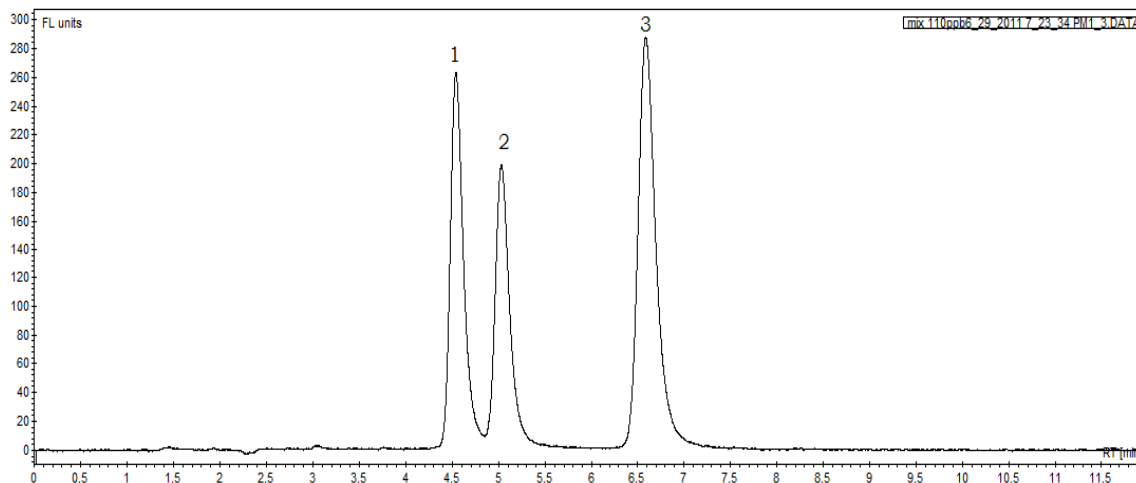
Dessa forma, foi avaliada mais uma combinação entre os solventes, diminuindo a proporção de acetonitrila: 0,02 M H₃PO₄:ACN; 83:17, v/v. Essa proporção foi a melhor obtida e o cromatograma está mostrado a seguir (Figura 11).

Figura 11: Cromatograma da melhor proporção dos solventes na fase móvel (0,02 M H_3PO_4 :ACN; 83:17, v/v). (1) norfloxacin e (2) ciprofloxacina, ambos à $100 \mu\text{g L}^{-1}$.



Após obtenção desta melhor condição de separação entre norfloxacin e ciprofloxacina, a enrofloxacin, composto com características mais apolares ($\log K_{ow}$ mais elevado) foi introduzida na mistura com os demais antimicrobianos e o cromatograma obtido está apresentado na Figura 12.

Figura 12: Cromatograma com a mistura dos três antimicrobianos na fase móvel (0,02 M H_3PO_4 :ACN; 83:17, v/v). (1) norfloxacin, (2) ciprofloxacina e (3) enrofloxacin, todos à $100 \mu\text{g L}^{-1}$.



Conforme esperado, a enrofloxacin apresentou um tempo de retenção maior que os outros compostos, devido a sua característica mais apolar e, portanto, maior interação com a cadeia de C18 da fase estacionária.

A Tabela 2 apresenta os tempos de retenção de cada antimicrobiano estudado por CLAE-FLU (Varian-LC 920). Esses valores correspondem a média de três injeções da mistura contendo os antimicrobianos (norfloxacin, ciprofloxacina e enrofloxacin).

Tabela 2: tempos de retenção e desvio padrão dos antimicrobianos estudados

Antimicrobianos	t_R (min)	DP
Norfloxacin	4,53	0,01
Ciprofloxacina	5,02	0,01
Enrofloxacin	6,582	0,006

t_R = tempo de retenção; DP=estimativa do desvio padrão.

Os valores da estimativa do desvio padrão demonstram que os tempos de retenção foram repetitivos, indicando uma boa precisão instrumental das injeções nas mesmas condições de operação. Além disso, a variação percentual das áreas cromatográficas, para replicatas de solução padrão, não foi maior que 1% para todos os antimicrobianos estudados.

4.1.3. Parâmetros cromatográficos

A Tabela 3 apresenta outros parâmetros cromatográficos, obtidos utilizando o software Galaxie Chromatography Data Systems (versão 1.9.302.530) e calculados de acordo com a Farmacopéia dos Estados Unidos.

Tabela 3: outros parâmetros cromatográficos.

Antimicrobianos	Assimetria do pico	Resolução	Eficiência
Norfloxacin	1,39	1,93(NOR/CIP)	5290,18
Ciprofloxacina	1,27	1,93(CIP/NOR) 5,33(CIP/ENR)	6067,95
Enrofloxacin	1,36	5,33(ENR/CIP)	6440,56

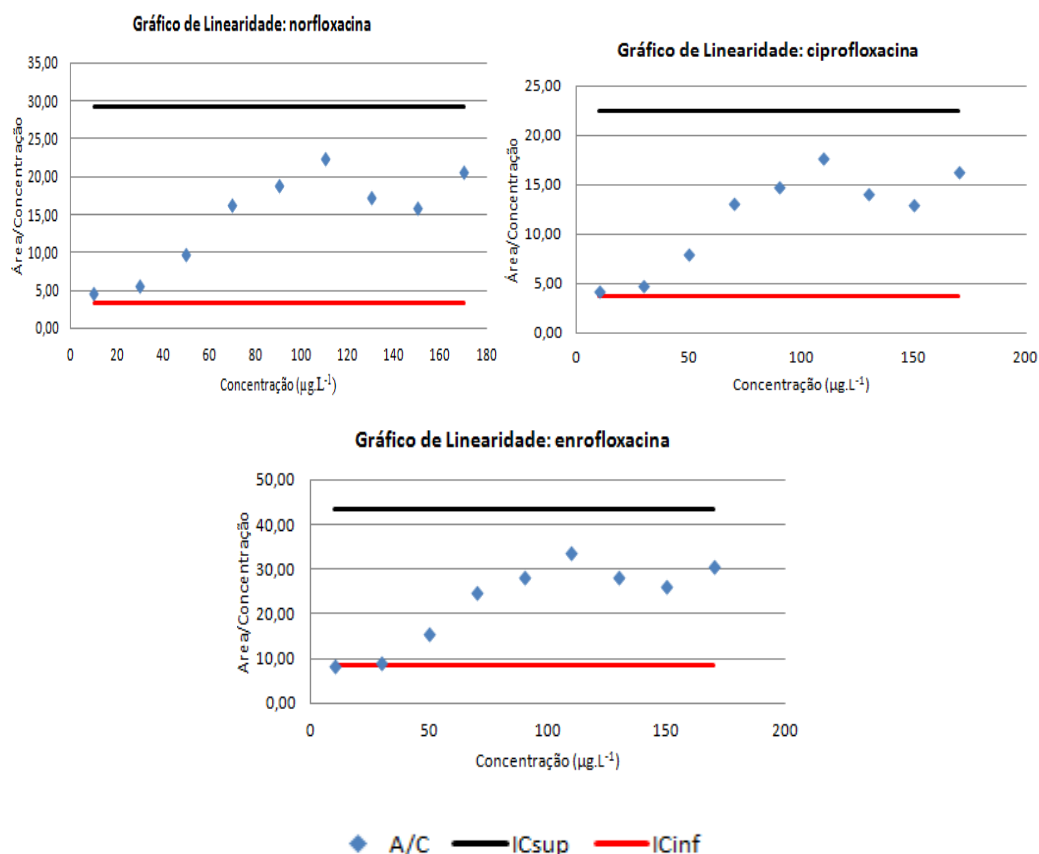
Observando a Tabela 3 conclui-se que o método cromatográfico apresenta boa simetria dos picos, muito próximos da idealidade que seria de 1, mostrando que não há encaudamento, apresentando também ótima eficiência. As resoluções entre os picos foram excelentes, pois estão de acordo com o preconizado pela literatura

para análise quantitativa em cromatografia (CAROL H. COLLINS; GILBERTO L. BRAGA; PIERRINA S. BONATO, 2006).

4.2. Linearidade de resposta do detector (CLAE-FLU, Varian 920)

Para determinar a região linear do detector para a norfloxacin, ciprofloxacina e enrofloxacin construíram-se gráficos como descrito no item 3.2.4. A Figura 13 apresenta os gráficos de linearidade de resposta do detector de fluorescência para a norfloxacin, ciprofloxacina e enrofloxacin no intervalo de 10 a 170 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Figura 13: curvas de linearidade dos antimicrobianos obtidas por CLAE-FLU, Varian 920.



A/C= Área/Concentração; ICsup=intervalo de confiança superior; ICinf=intervalo de confiança inferior.

Pode-se observar que todos antimicrobianos estudados situaram-se entre 10-170 $\mu\text{g L}^{-1}$, uma vez que todos os pontos ficaram dentro da região linear (entre os limites superior e inferior).

4.2.1. Curvas analíticas (CLAE-FLU, Varian 920)

As curvas analíticas foram construídas para os três antimicrobianos na região linear do detector determinada no item 4.2 (10 a 170 $\mu\text{g L}^{-1}$ para todos os analitos). A Figura 14 e Tabela 4 apresentam as curvas analíticas, a equação da reta e seus respectivos coeficientes de correlação (R^2).

Figura 14: curvas analíticas preparadas em água para os três antimicrobianos.

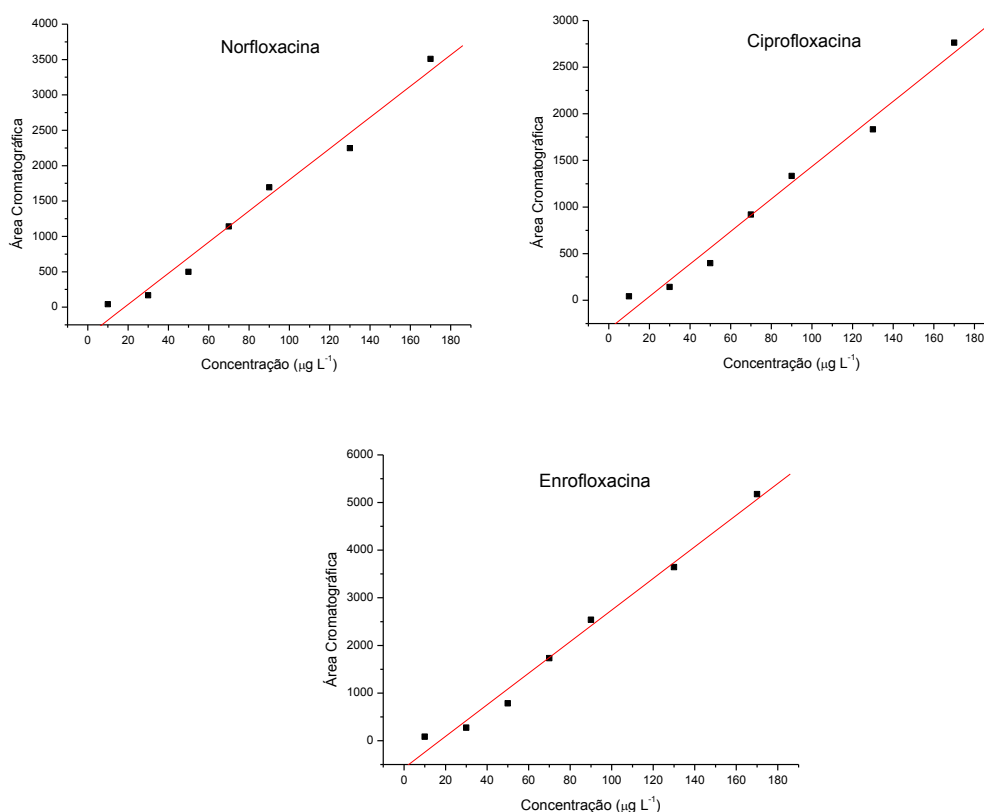


Tabela 4: Equações das curvas analíticas preparadas no solvente e seus respectivos coeficientes de correlação.

Antimicrobianos	Equações da reta	Coeficientes de correlação
Norfloxacina	$y = 22,1x - 403,9$	0,990
Ciprofloxacina	$y = 17,4x - 309,5$	0,992
Enrofloxacina	$y = 33,2x - 574,7$	0,994

Bons coeficientes de correlação foram obtidos para os antimicrobianos e estão de acordo com o preconizado pela literatura (ANVISA apud RIBANI et al., 2004).

4.3. Limites de detecção e quantificação do equipamento (CLAE-FLU, Varian 920)

A Tabela 5 apresenta os limites de detecção (LDe) e quantificação (LQe) do equipamento, conforme descrito no item 3.2.5.

Tabela 5: limites de detecção e quantificação do equipamento CLAE-FLU (varian 920).

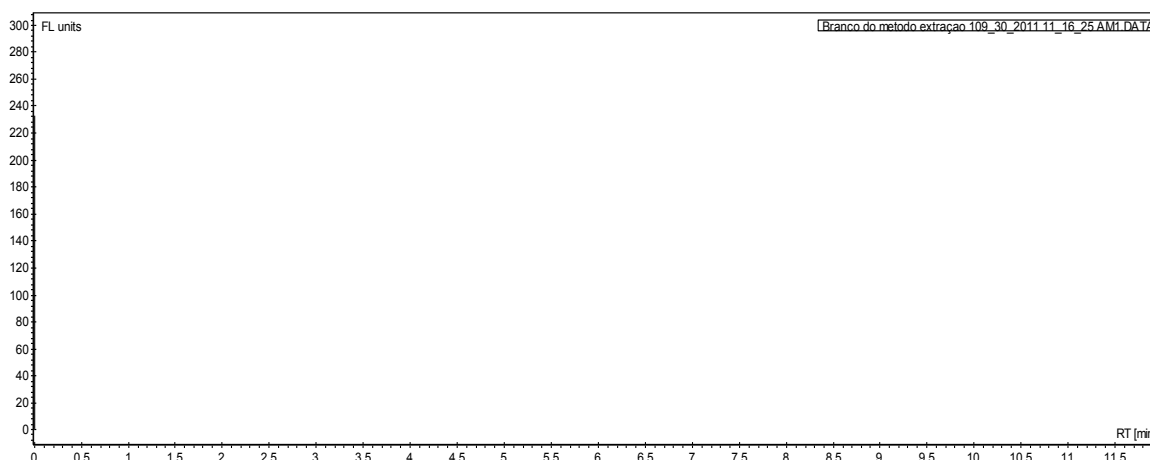
Antimicrobianos	LDe ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQe ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Norfloxacin	10	10
Ciprofloxacin	10	10
Enrofloxacin	10	10

Os limites de detecção e quantificação do equipamento foram ambos iguais a $10 \mu\text{g L}^{-1}$, uma vez que a concentração referente ao LDe é linear e faz parte das curvas analíticas preparadas em solvente (Figura 14 e Tabela 4 anteriores).

4.4. Branco do método

O cromatograma apresentado na Figura 15 é referente ao branco do método proposto (todo o processo de extração com solventes e reagentes, exceto a amostra) e indica que não existem picos interferentes nos tempos de retenção dos antimicrobianos estudados.

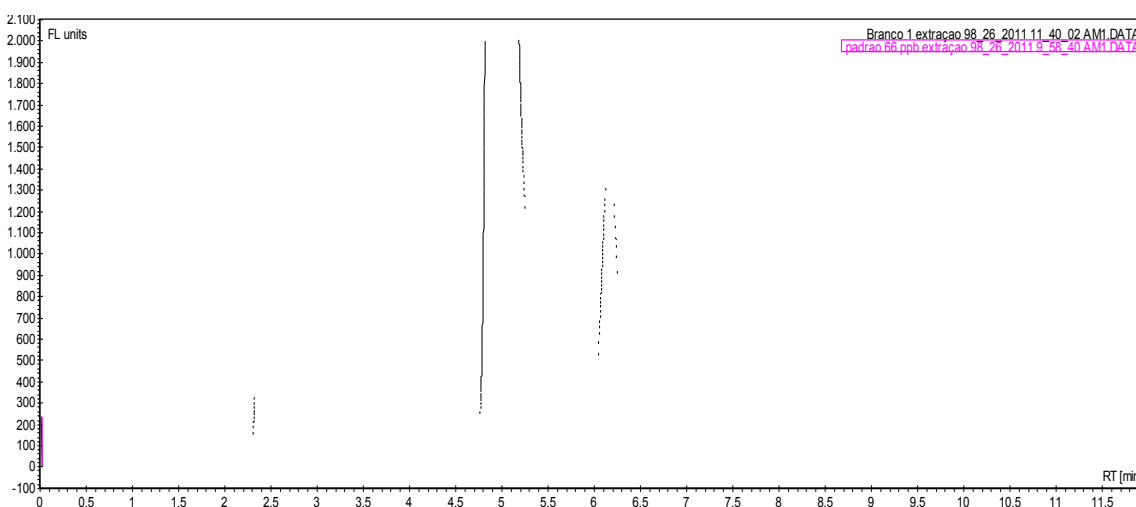
Figura 15: cromatograma referente ao branco do método.



4.5. Avaliação da amostra de cama de frango

O método proposto (Figura 7, item 3.2.7.) foi utilizado para extração das amostras de cama de frango e o cromatograma da Figura 16 ilustra o resultado obtido.

Figura 16: cromatograma sobreposto (condições cromatográficas descritas no Quadro 3) referente a matriz de cama de frango (em preto) obtida pelo método de extração proposto Figura 7 item 3.2.7.) e uma mistura de soluções padrões dos antimicrobianos (em rosa).



O cromatograma da amostra mostra vários picos, os quais três saíram no mesmo tempo de retenção dos três antimicrobianos estudados. Porém, não é possível afirmar que tais picos interferentes na amostra são os antimicrobianos estudados, uma vez que só tempo de retenção é insuficiente para essa caracterização. Dessa forma, análises posteriores utilizando cromatografia líquida com espectrômetro de massas serão realizadas para confirmação da identidade desses picos, por se tratar de uma técnica mais fidedigna na caracterização espectral.

4.6. Avaliação do efeito matriz

O efeito matriz pode causar um aumento ou diminuição da resposta do detector de um determinado analito se comparado com solvente orgânico. Para corrigir esse efeito é preciso preparar as curvas analíticas, utilizando o próprio extrato da matriz. Dessa forma, 1 mL do extrato da amostra de cama de frango obtido pelo método de extração proposto detalhado no fluxograma da Figura 7 (item

3.2.7) foi evaporado sob atmosfera de nitrogênio (N₂) e, após total secura, o resíduo foi dissolvido em 250 µL da mistura dos padrões de antimicrobianos preparadas em água em concentrações correspondente aos diferentes pontos da curva analítica.

A Figura 17 e Tabela 6 apresentam as curvas analíticas, a equação da reta e os respectivos coeficientes de correlação (R²) para os analitos preparados no extrato da matriz.

Figura 17: curvas analíticas preparadas no extrato da matriz para os três antimicrobianos.

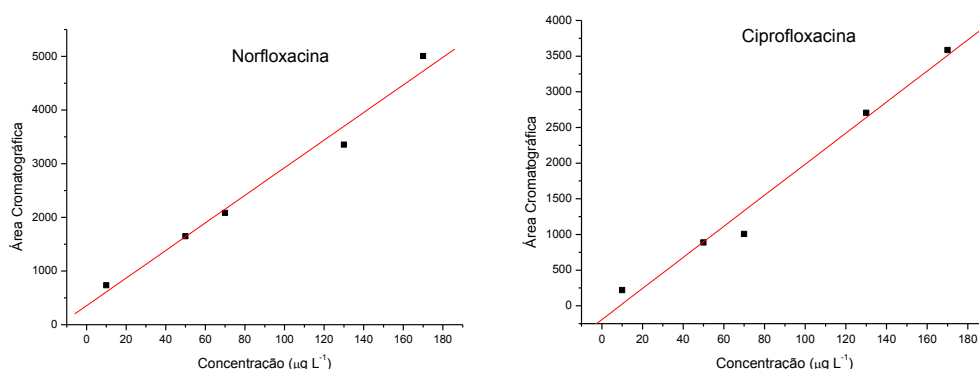


Tabela 6: Equações das curvas analíticas preparadas no extrato da matriz e seus respectivos coeficientes de correlação.

Antimicrobianos	Equação da reta	Coeficiente de correlação
Norfloxacin	$y = 25,7 + 353,8x$	0,990
Ciprofloxacin	$y = 21,8 + 192,9x$	0,990
Enrofloxacin*	$y = 9,1 + 56,2x$	0,992

*Diluição de 100x

Bons coeficientes de correlação foram obtidos para as curvas analíticas preparadas no extrato da cama de frango, assim como as curvas analíticas preparadas em solvente (ANVISA apud RIBANI et al., 2004).

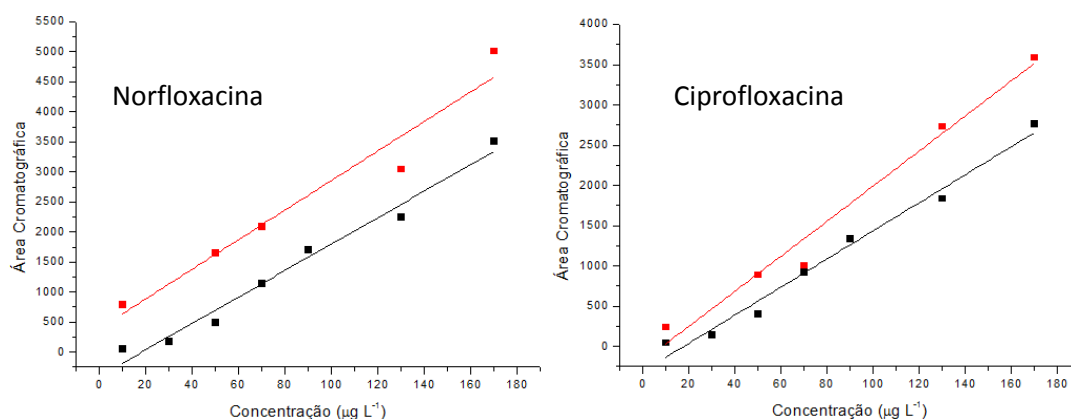
Na Tabela 7 estão apresentados os resultados da avaliação do efeito matriz obtidos comparando os coeficientes angulares das curvas analíticas preparadas na matriz e em solvente conforme descrito no item 3.2.9.

Tabela 7: Resultados do efeito de matriz.

Antimicrobianos	% efeito matriz
Norfloxacina	16,29
Ciprofloxacina	19,91

O efeito de matriz foi pronunciado para todos os antimicrobianos, pois a relação entre os coeficientes angulares foi acima de 10% aceitáveis (THOMPSON; ELLISON; EWOOD, 2002) e a Figura 18 mostra as curvas analíticas preparadas em solvente e na matriz, evidenciando a diferença de sensibilidade entre elas.

Figura 18: Curvas analíticas preparadas no extrato da matriz (em vermelho) e em solvente (em preto) para os três antimicrobianos.

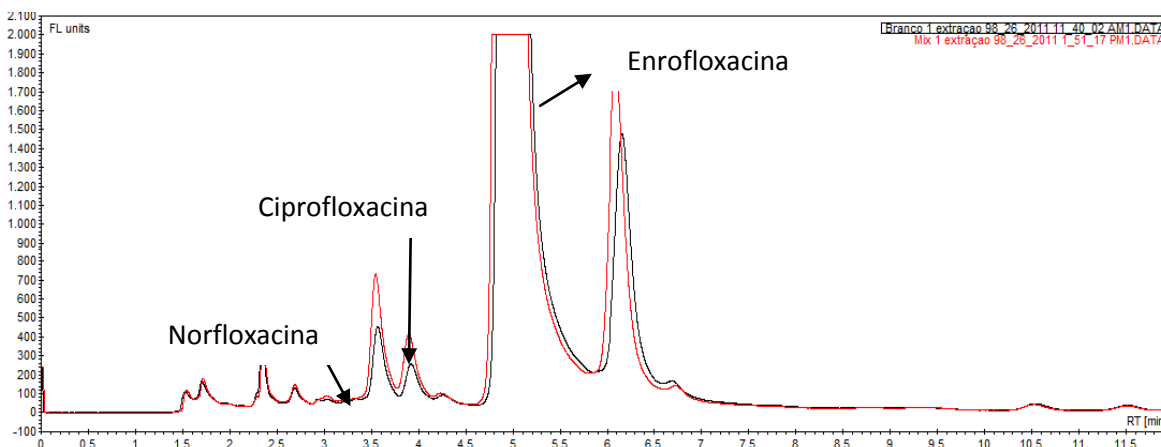


Esse efeito matriz pode ser justificado devido a elevada complexidade da cama de frango e devido os interferentes nos mesmos tempos de retenção dos analitos. É importante ressaltar que a curva analítica preparada na matriz incorpora uma correção nos resultados de recuperação, demonstrando um valor mais próximo do real. Dessa forma, as etapas para avaliação da recuperação foram realizadas utilizando as curvas analíticas preparadas na matriz.

4.7. Exatidão e Precisão

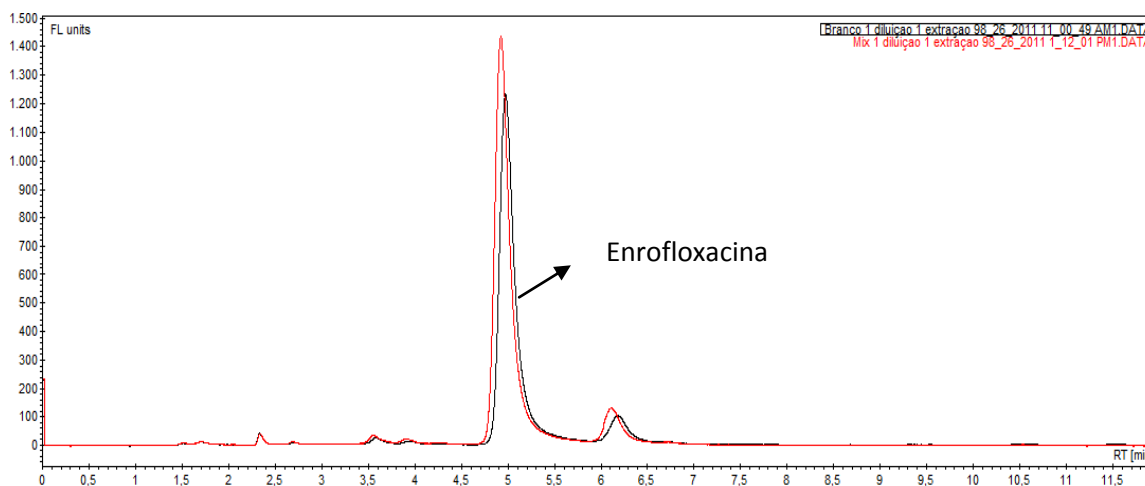
Para avaliação da exatidão e precisão as amostras de cama de frango foram fortificadas conforme descrito no item 3.2.8. e submetidas ao método de extração proposto (Figura 7, item 3.2.7.). Os cromatogramas da Figura 19 ilustra amostra de cama de frango não fortificada e uma fortificada.

Figura 19: cromatograma sobrepostos referente às amostras de cama de frango não fortificada (em preto) e fortificada (100 ng g⁻¹, em vermelho).



Para avaliar a recuperação da enrofloxacin, foi necessário diluir a amostra em 10 vezes, uma vez que há um pico interferente no mesmo tempo de retenção dela, conforme já discutido nos itens anteriores dessa monografia. O cromatograma após esta diluição está apresentado abaixo (Figura 20).

Figura 20: Cromatograma sobrepostos referente às amostras de cama de frango não fortificada (em preto) e fortificada (100 ng g⁻¹, em vermelho). Ambas diluídas 10 vezes



Os cromatogramas das Figuras 19 e 20 indicam que houve a recuperação dos analitos, pois os sinais cromatográficos das matrizes fortificadas (cromatogramas em vermelho) apresentaram foram superiores aos das camas de frango não fortificadas (cromatogramas em preto).

A Tabela 8 apresenta as recuperações percentuais e os coeficientes de variação do método proposto para os antimicrobianos, utilizando as curvas analíticas preparadas na matriz.

Tabela 8: Recuperações percentuais e os coeficientes de variação dos antimicrobianos estudados

Antimicrobianos	Recuperação (%)	CV (%)
Norfloxacina	149	6
Ciprofloxacina	166	3
Enrofloxacina	143	16

Para o método ser exato as porcentagens de recuperação devem estar inseridas na faixa de 70 a 120 % que é estabelecida adequada pela literatura. E para o método ser considerado preciso os valores de coeficiente de variação devem inferiores a 20% (RIBANI *et al.*, 2004).

Pode ser observado que os coeficientes foram menores que 16% para os três antimicrobianos, portanto o método é preciso no nível de fortificação avaliado (100 ng g⁻¹). As porcentagens de recuperação situaram-se acima do que a literatura recomenda (143 a 166%). Entretanto, estes valores são mais adequados do que os descritos por Karci e Balcioglu (2009), Boonsaner e Hawker(2009) e Uslu *et al.* (2007), que também determinaram compostos em comum ao presente estudo em cama de frango.

Uma melhoria nas porcentagens de recuperação poderia ser alcançada realizando-se etapas de *cleanup* utilizando cartuchos de C18 ou de poliestirenodivinilbenzeno, frequentemente utilizado em trabalhos encontrados na literatura (CRISTIAN *et al.*, 2003, BOONSANER e HAWKER, 2009). Essa etapa, provavelmente, irá proporcionar uma limpeza do extrato, diminuindo os interferentes de uma matriz tão complexa como a cama de frango.

Uma desvantagem da utilização do *cleanup* é o aumento no tempo de análise, uma vez que o método proposto realiza apenas extração sólido-líquido e, portanto, uma análise muito mais simples e rápida. Mais rápida inclusive que o método descrito por Zhao et al. (2010) que realiza a lavagem do precipitado uma vez a mais que o presente estudo, aumentando o tempo de análise em torno de 41 minutos.

4.8. Análise dos padrões analíticos em LC-ESI-MS/MS-MRM-QTrap

Os critérios de identificação foram traçados de acordo com a comparação dos resultados obtidos das análises dos padrões analíticos em comparação com as amostras. Para que obtivesse resultados substancialmente confiáveis do ponto de vista analítico realizaram-se experimentos híbridos que permitiram trabalhar tanto em modo quantitativo de grande seletividade (modo MRM) quanto em modo qualitativo (EPI – enhanced Product Ion) o que confere ao método uma seletividade ainda maior, pois este procedimento fornece um espectro de massa em modo MS² a mais. Na verdade a técnica funciona como se tivesse dois sistemas em MS² trabalhando em paralelo, o que aumenta consideravelmente a seletividade principalmente quando se trabalha em nível de traço. Portanto, estabelece-se uma metodologia que praticamente fornece identificação inequívoca das substâncias em estudo.

Figura 21: Cromatogramas referentes aos padrões dos três antimicrobianos (a-norfloxacina, b-ciprofloxacina e c-enrofloxacina) analisados por LC-ESI-MS/MS modo MRM (monitoramento de reações múltiplas).

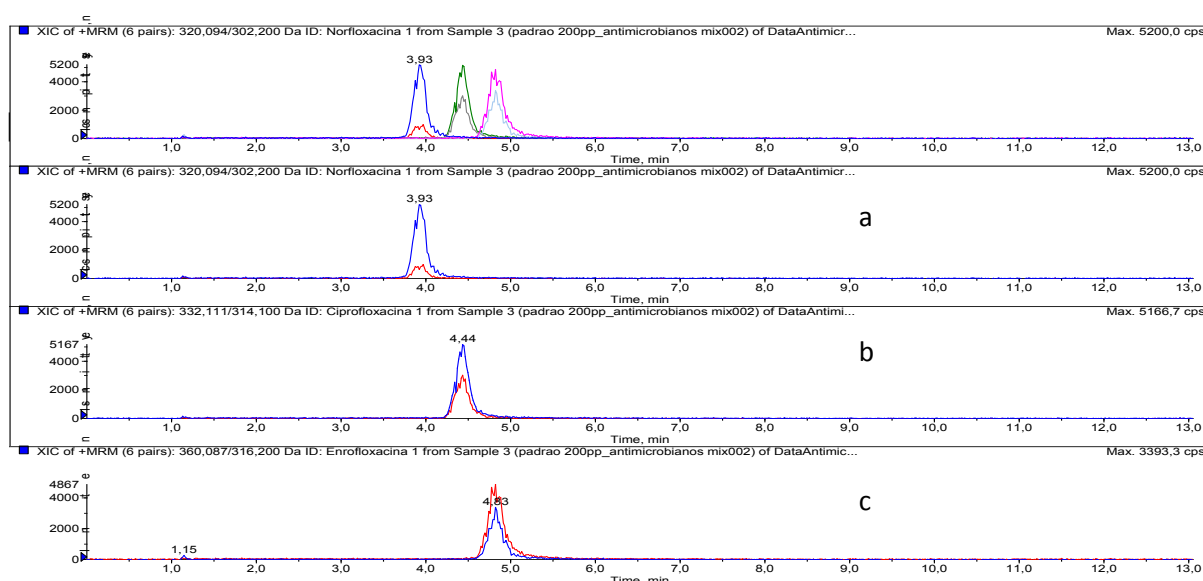


Figura 22: Cromatogramas referentes aos padrões dos três antimicrobianos (a-norfloxacina, b-ciprofloxacina e c-enrofloxacina) analisados por LC-ESI-MS/MS -QTrap modo MRM –EPI (Enhanced Product Ion).

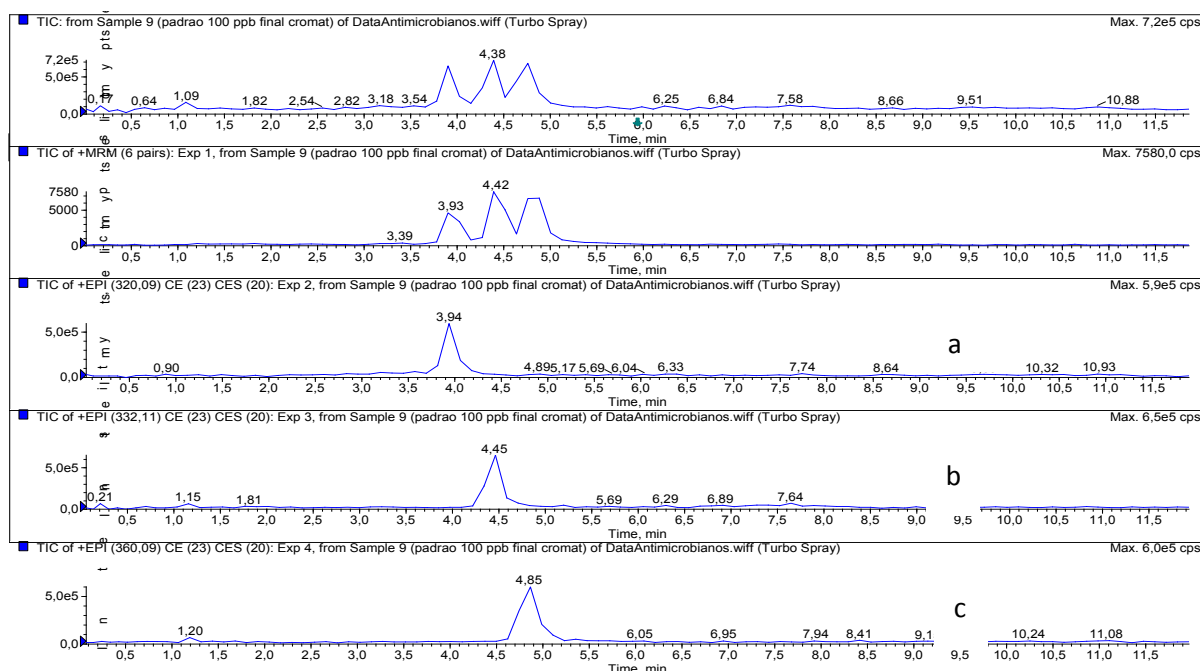


Figura 23: Cromatogramas e espectros de massa referentes aos padrões dos três antimicrobianos (a-norfloxacina, b-ciprofloxacina e c-enrofloxacina) analisados por LC-ESI-MS/MS -QTrap modo MRM –EPI (Enhanced Product Ion).

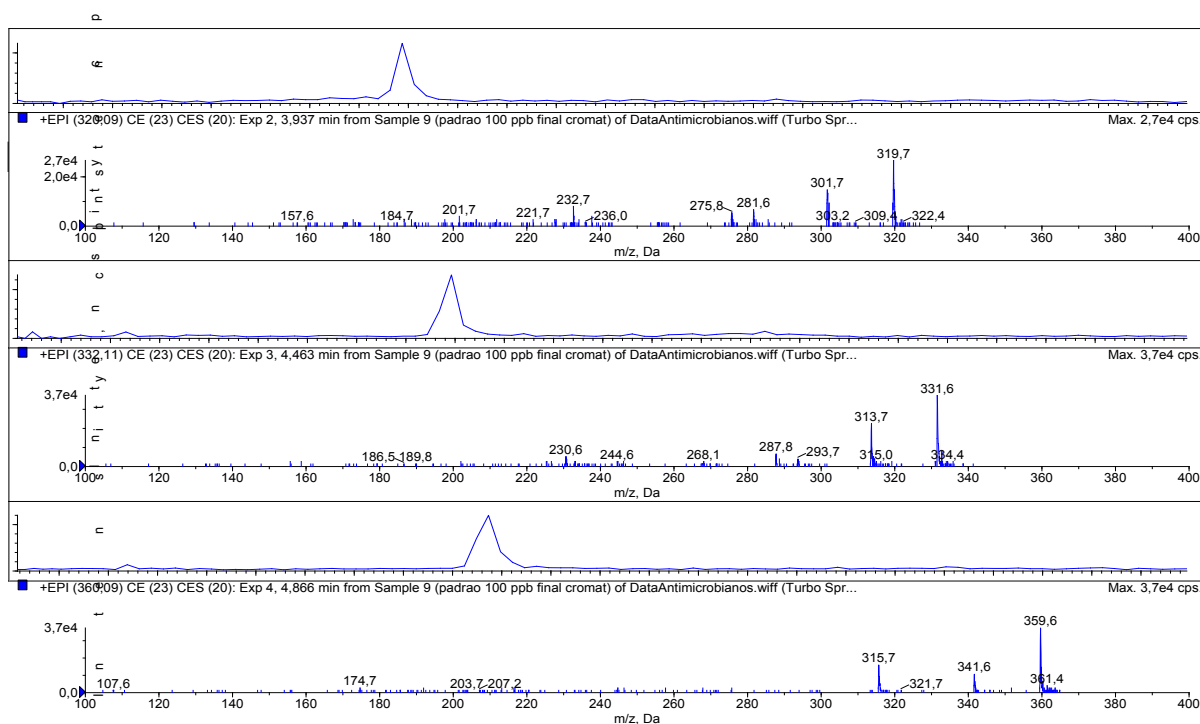
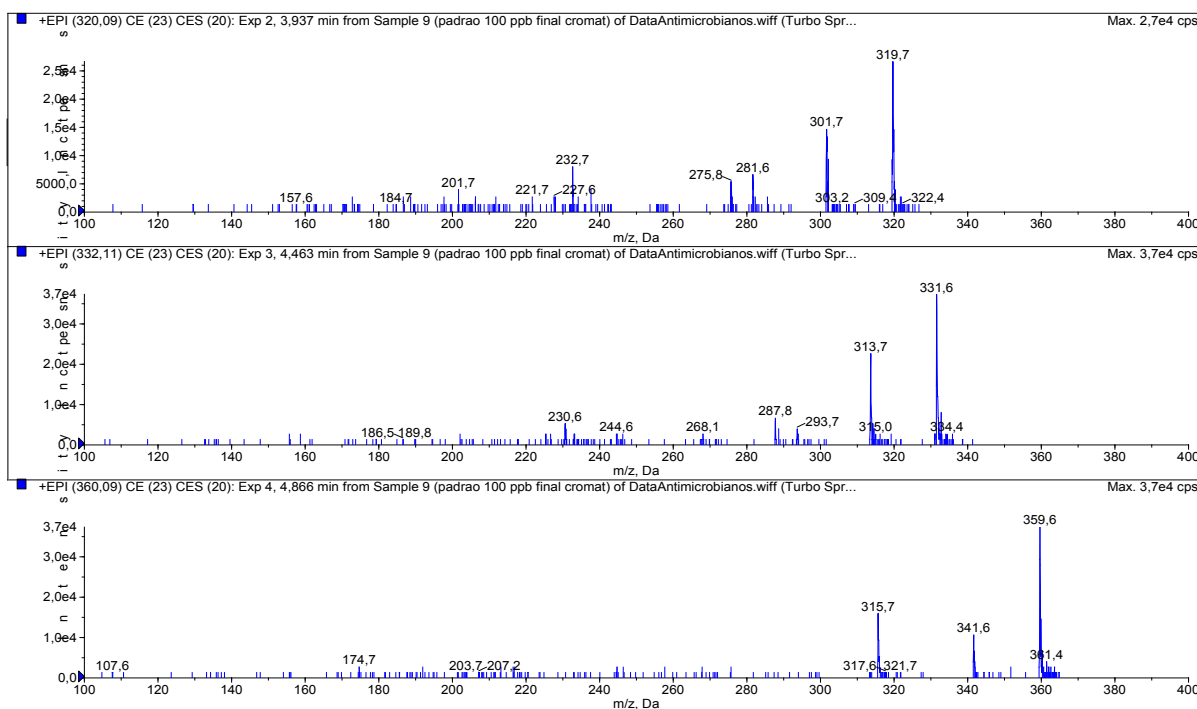


Figura 24: Ampliação dos espectros de massa (**Figura 23**) referentes aos padrões dos três antimicrobianos (a-norfloxacina, b-ciprofloxacina e c-enrofloxacina) analisados por LC-ESI-MS/MS - QTrap modo MRM –EPI (Enhanced Product Ion).

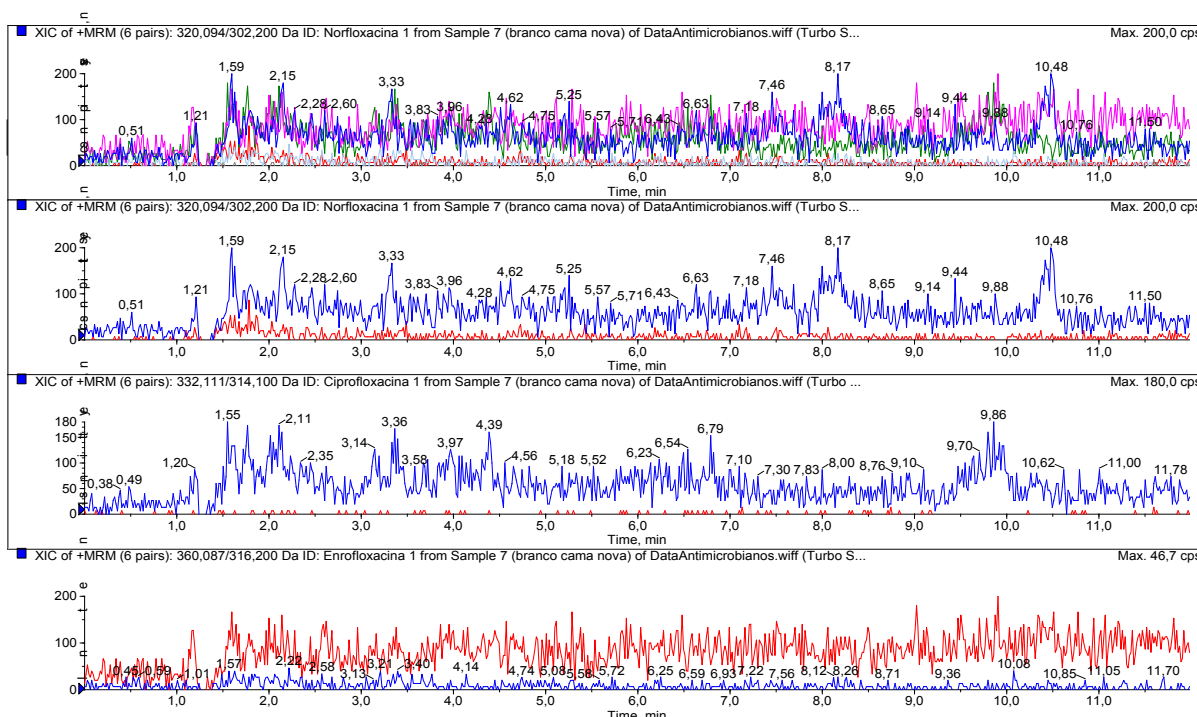


4.9. Análise das amostras de cama de frango

4.9.1. Cama de frango orgânica, obtida da UNESP Jaboticabal

De acordo com a Figura 25 conclui-se pelo experimento de MRM que a amostra de cama de frango orgânica obtida da UNESP Jaboticabal possui nenhum dos três antimicrobianos estudados. Nenhum espectro de EPI foi obtido devido obviamente a ausência das substâncias em questão.

Figura 25: Análise da amostra de cama orgânica evidenciando a ausência dos três antimicrobianos (a-norfloxacina, b-ciprofloxacina e c-enrofloxacina) analisados por LC-ESI-MS/MS -QTrap modo MRM –EPI (Enhanced Product Ion).



4.9.2. Cama de frango comercial, obtidas de produtores de frango de corte na região de Araraquara

Na amostra de cama de frango comercial detectou-se a presença dos antimicrobianos ciprofloxacina e enrofloxacina, sendo que a ciprofloxacina está presente em concentração reduzida em relação a enrofloxacina. Fica evidente que essa afirmação relaciona-se apenas as intensidades dos picos obtidos em um método qualitativo, não estamos inferindo informações relacionadas a quantificação do analito, pois trata-se de um método que não foi validado em termos quantitativos no sistema LC-ESI-MS/MS-MRM-QTrap.

As Figuras de 26 a 29 demonstram os cromatogramas e os espectros por meio dos experimentos ESI-MS/MS-MRM-EPI o que tornou a identificação inequívoca das substâncias, mesmo àquelas que estão em concentrações muito baixas como a ciprofloxacina.

É importante ressaltar que apesar das Figuras 26 a 29, referentes aos experimentos, estarem sendo apresentadas separadamente, os modos de análise MRM e EPI acontecem simultaneamente.

Figura 26: Cromatogramas referentes a amostra cama de frango comercial com detecção de dois dos três antimicrobianos (ciprofloxacina e enrofloxacin) analisados por LC-ESI-MS/MS modo MRM (monitoramento de reações múltiplas).

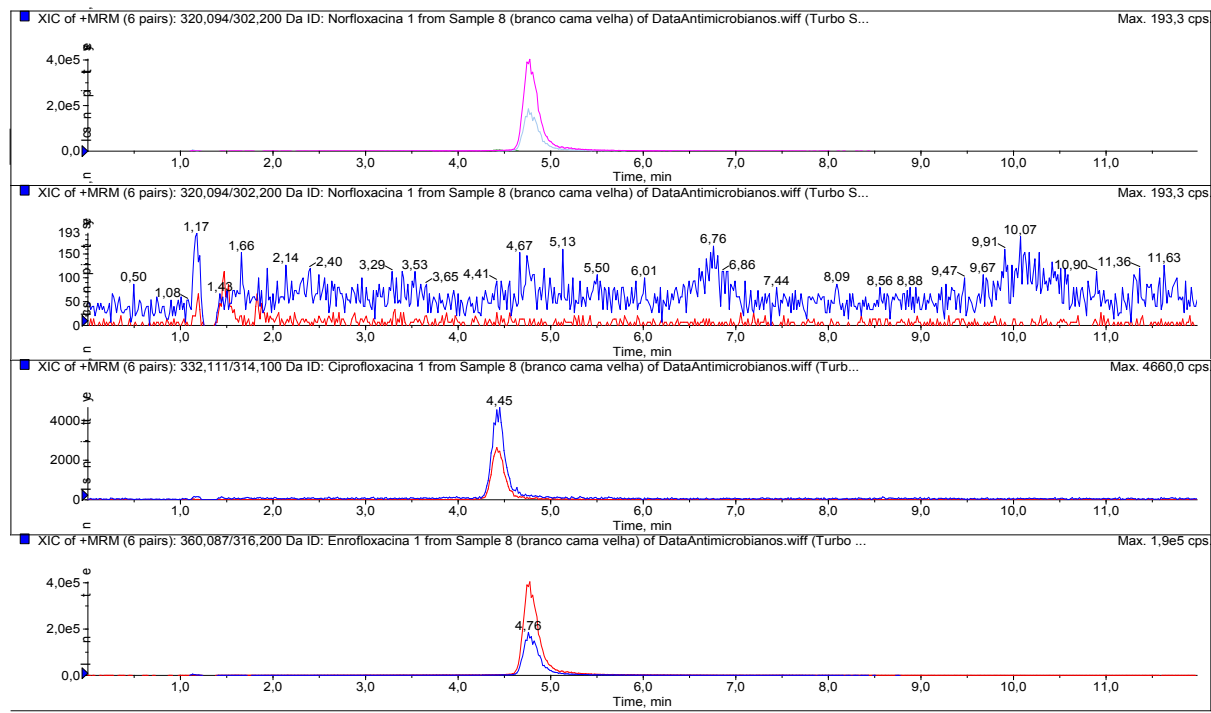


Figura 27: Ampliação dos espectros de massa (**Figura 26**) referentes aos padrões dos dois antimicrobianos detectados (b-ciprofloxacina e c-enrofloxacin) analisados por LC-ESI-MS/MS -QTrap modo MRM –EPI (Enhanced Product Ion).

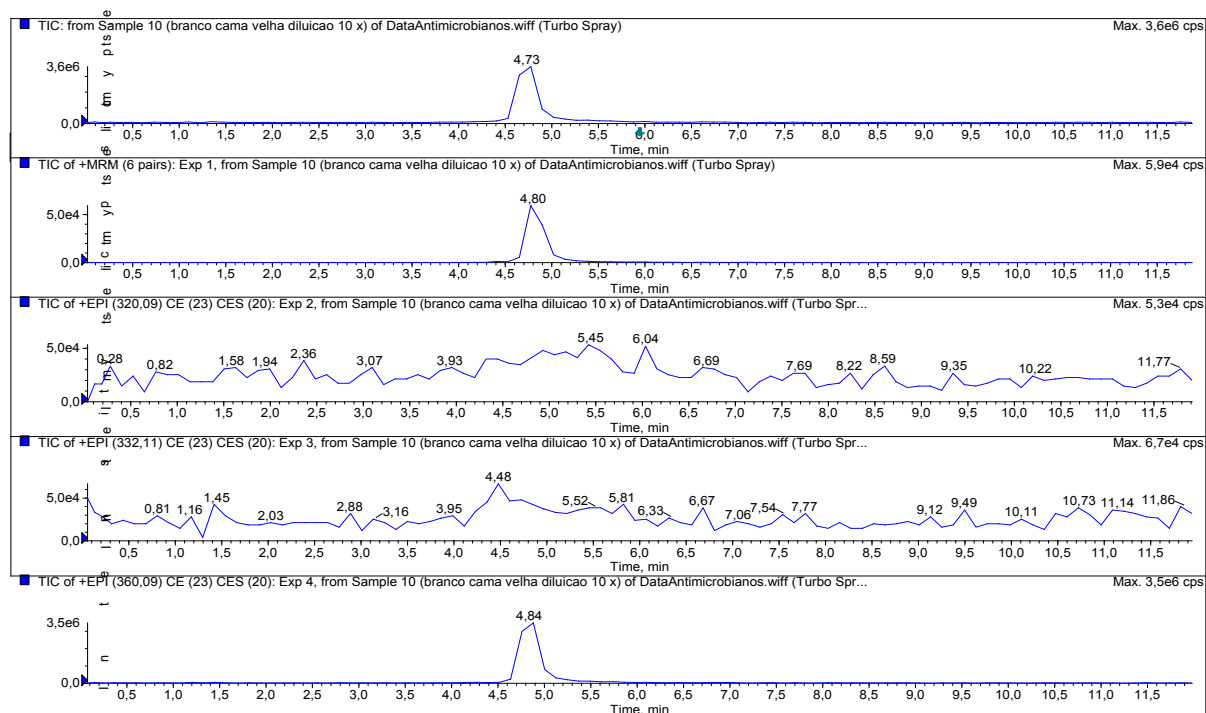


Figura 28: Cromatogramas e espectros de massa referentes aos dois antimicrobianos detectados (b-ciprofloxacina e c-enrofloxacinina) analisados por LC-ESI-MS/MS -QTrap modo MRM –EPI (Enhanced Product Ion).

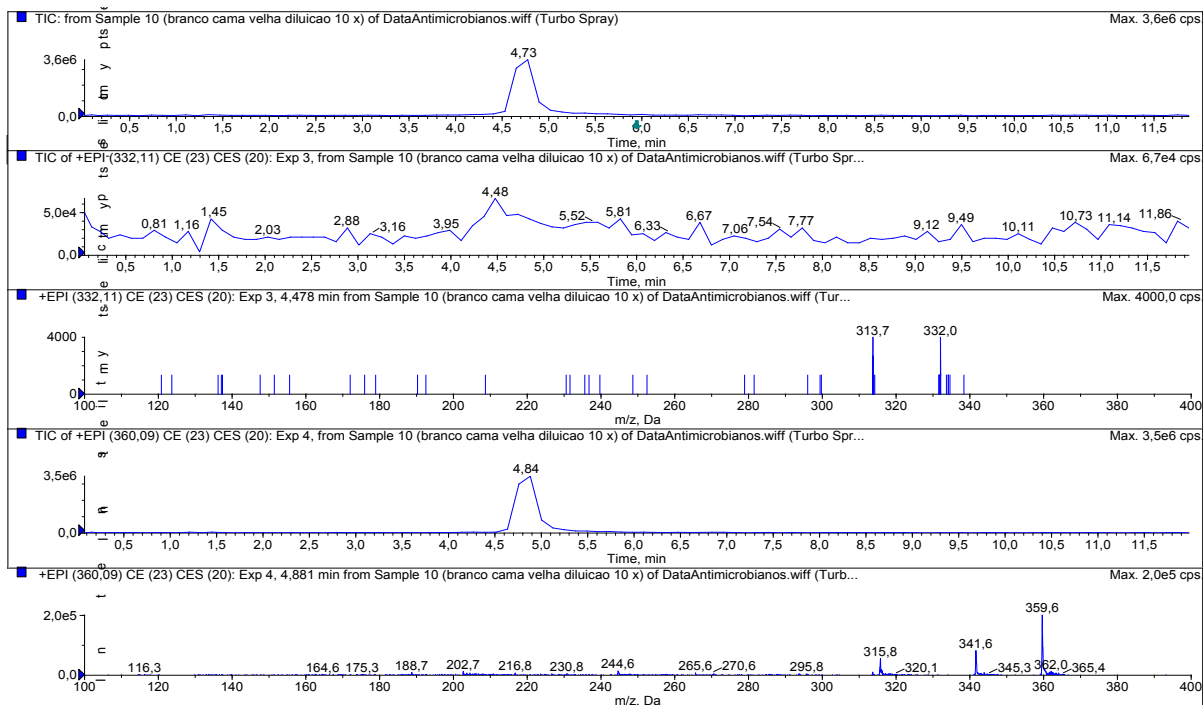
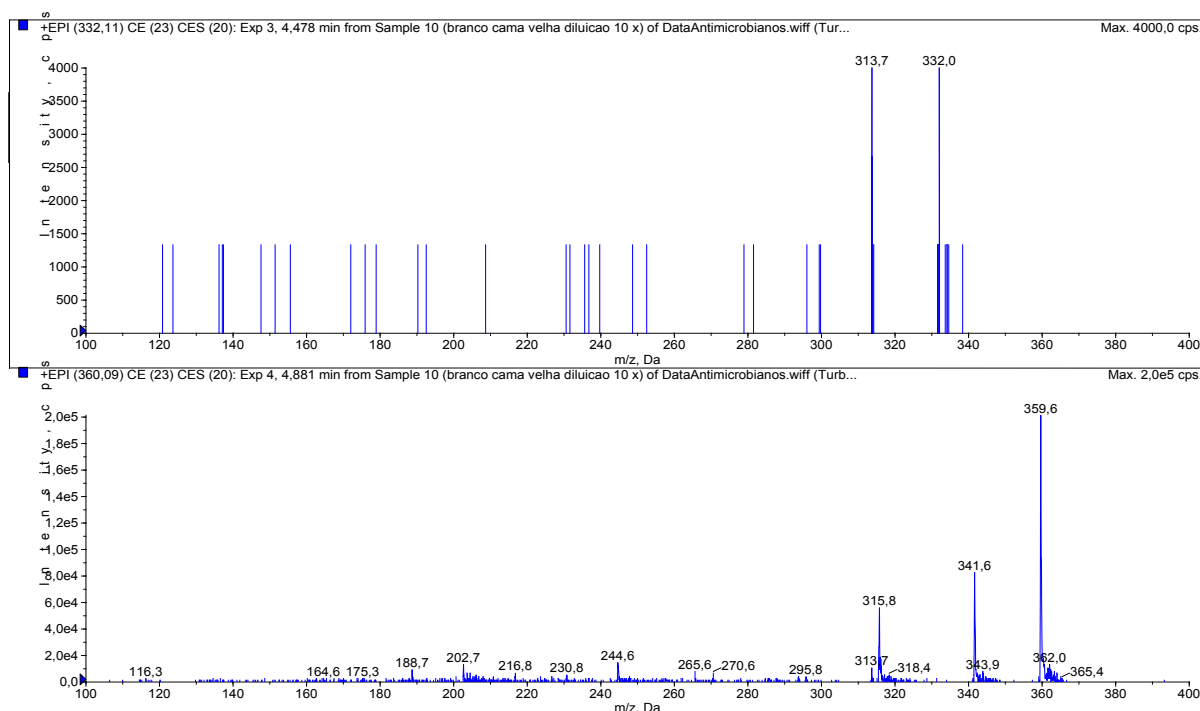


Figura 29: Ampliação dos espectros de massa (Figura 28) referentes aos antimicrobianos detectados (b-ciprofloxacina e c-enrofloxacinina) analisados por LC-ESI-MS/MS -QTrap modo MRM –EPI (Enhanced Product Ion).



5. Conclusão

Conclusões gerais:

- ✓ As condições cromatográficas otimizadas permitem analisar, simultaneamente, os três antimicrobianos estudados em um tempo relativamente curto (7,5 minutos);
- ✓ Os parâmetros cromatográficos (resolução, simetria e eficiência) estão de acordo com a literatura para que se possa realizar uma análise quantitativa confiável;
- ✓ Foram determinados os seguintes critérios de validação: intervalo de trabalho, linearidade do detector, limites de detecção e quantificação, exatidão e precisão;
- ✓ O método de extração proposto é simples, rápido, com boa precisão, porém deve-se aprimorar ligeiramente a exatidão, através dos ensaios de recuperação;
- ✓ Para os próximos trabalhos pretende-se introduzir uma etapa de *cleanup* no método de extração, para a eliminação dos interferentes observados.

Conclusão específica:

- ✓ O método otimizado para determinação de ciprofloxacina, enrofloxacin e norfloxacina em cama de frango atende a diversos critérios de validação pertinentes a este estudo e, portanto, pode ser útil para outros trabalhos com cenários similares.

REFERÊNCIAS

- ANDRIOLE, V.T. The Quinolones. 3.ed. Maryland Hights: Elsevier, 2000.
- APPELBAUM, P.C.; HUNTER, P.A. The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v.16, p.5-15, 2000.
- ARAUJO, F. A.; JORGE NETO, P. N.; SUNDFELD, M. A. G. Cama de frango na alimentação animal. Publicado em 2007. Disponível em: <http://pt.engormix.com/MA-pecuaria-corte/nutricao/artigos/cama-frango-alimentacao-animal-t86/141-p0.htm> Acesso em 15 abril 2011.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES E EXPORTADORES DE FRANGO. Relatório anual, 2008/2009. Disponível em: http://www.abef.com.br/Relatorios_Anuais.php Acesso em: 18 março. 2011.
- BARRETO, N.A.; SANT'ANA, R.R.P.; SILVA, L.G.B.; UEHARA, A.A.; GUIMARÃES, R.C.; DUARTE, I.M.; ASENSI, M.D.; Caracterização fenotípica e molecular de *Neisseria gonorrhoeae* isoladas no Rio de Janeiro, 2002-2003. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**. V. 16, n.3, p. 32-42, 2004.
- BARROW, P. A. et al.. Effect of enrofloxacin administration on excretion of Salmonella enteritidis by experimentally infected chickens and on quinolone resistance of their Escherichia coli flora. *Avian Pathology*, Huntingdon, Inglaterra, v. 27, n. 6, p. 586-590, 1998.
- BOONSANER, M; HAWKER, D. W. Accumulation of oxytetracycline and norfloxacin from saline soil by soybeans. **Science of the Total Environment**, v. 408, p. 1731-1737, 2010.
- BOXALL, A. B. A.; FOGG, L. A.; BAIRD, D. J.; LEWIS, C.; TELFER, T. C.; KOLPIN, D.; GRAVELL, A. Targeted monitoring study for veterinary medicines in the environment. **Final Science Report the United Kingdom Environmental Agency**, 2005.
- CAROL H. COLLINS; GILBERTO L. BRAGA; PIERINA S. BONATO, **Fundamentos de Cromatografia**. Editora da Unicamp, Campinas, 2006.
- CLAUS, J. W. Genética molecular e variação genética em bactérias e viroses bacterianas. In: CARTER, G. R, Fundamentos de bacteriologia e micologia veterinária. São Paulo: Roca, 1988. p. 39-64.
- CHRISTIAN, T.; SCHNEIDER, R. J.; FARBER, H. A.; SKUTLAREK, D.; MEYER, M. T.; GOLDBACH, H. E. Determination of antibiotics residues in manure, soil and surface waters. **Acta Hydrochimica et Hydrobiologica**, v. 31, p. 36-44, 2003.
- CRUZ, F.G.G. **Avicultura caipira na Amazônia**. Manaus: EDUA, 2001.
- EMBRAPA. Empresa Brasileira de Agricultura e Pecuária. Sistemas de produção de frango de corte. Versão eletrônica, jan 2003. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Ave/ProducaoDeFrangodeCorte/index.html> Acesso em 15 abril 2011.
- GONZALES, E.; CAFÉ, M.B.; LEANDRO, N.S.M. Boas práticas no uso de medicamentos pela indústria avícola. In: PALERMO, J.; SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S.L. (Ed.). **Farmacologia Aplicada à Avicultura**. São Paulo: Roca, 2005. cap. 18, p. 265 – 285.
- GOSS, D.W., 1992. Screening procedure for soils and pesticides for potential water quality impacts. **Weed Technology**, v. 6, p. 701-708.
- HAHN, L. **Processamento da cama de aviário e suas implicações nos Agroecossistemas**. 2004. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

- HIGGINS, P.G.; FLUIT, A.C.; SCHMITZ, F.J. Fluoroquinolones: structure and target sites. *Current Drug Targets*, v.4, p.181-189, 2003.
- KARCI, A.; BALCIOGLU, I. A.; Investigation of the tetracycline, sulfonamide and fluroquinolone antimicrobial compounds in animal manure and agricultural soils in Turkey. **Science of the Total Environment**, v. 407, p. 4652-4664, 2009.
- KUMAR, K; GUPTA, S. A.; CHANDER, Y; SINGH, A. K. Antibiotic use in agriculture and its impact on the terrestrial environment. **Advances in Agronomy**, v. 87,p. 4, 2005.
- LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos: RiMa, 2004.
- LEME, P. R.; ALLEONI, G. F.; CAVAGUTI, E. Utilização da cama de frango na alimentação de bovinos. **Simpósio sobre Resíduos da Produção Avícola**, 2000.
- LIMA, F.R. Aditivos Zootécnicos: enzimas. In: PALERMO, J.; SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S.L. **Farmacologia Aplicada à Avicultura**. São Paulo: Roca, 2005. p. 239 - 248.
- LINDBERG, R; JARNHEIMER, P. A.; OLSEN, B; JOHANSSON, M; TYSKLIND, M.; Determination of antibiotic substances in hospital sewage water using solid phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry and group analogue internal standards. **Chemosphere**, v 57, p. 1479-1488, 2004.
- MARTINEZ-CARBALO, E.; BARREIRO-GONZALES, C.; SCHARF, S.; GANS, O. Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria. **Environmental Pollution**, v. 148, p. 570-579, 2007.
- NICOLETTI, M.A. Aspectos farmacotécnicos relevantes na elaboração de medicamentos e rações. In: PALERMO, J.; SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S.L. **Farmacologia Aplicada à Avicultura**. São Paulo: Roca, 2005. p. 37 - 52.
- OVIEDO-RONDÓN, E. O. Tecnologias para mitigar o impacto ambiental da produção de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 239-252, 2008.
- PADILHA, Terezinha. Promotores Naturais de Crescimento – Suplemento Especial da Revista **Ave Word**, Editora Chefe Paulinia Sp – Ano 3, no 15 Abril/Maio de 2005;
- PAGANINI, F. J. Manejo da cama. In: Produção de frangos de corte. A. A. Mendes, I.A. Naas & M. Macari (Eds.). p. 107-116. FACTA, Campinas, SP. Brasil, 2004.
- PALERMO, J, N. Uso de medicamentos veterinários: Impactos na moderna avicultura. In: SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA, 2006. **Chapécó. Anais**. p. 70-78, 2006.
- PARK, H.R.; KIM, T.H.; BARK, K.M. Physicochemical properties of quinolone antibiotics in various environments. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v.37, p.443-460, 2002.
- PICÓ, Y.; ANDREU, V. Fluoroquinolones in soil – risks and challenges. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 387, p. 1287-1299, 2007.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C.; JARDIM, I. C. F. S.; MELO, L. F. C. Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-80, 2004.
- RILEY, C.M., ROSANSKE, T.W. Development and validation of analytical methods. **Pergamon Press**, 1996.
- ROPPIA, L. Brasil:O consumo de carnes passado a limpo. **Aveword**. 2008.
- SARCINELLI, M. F.; VENTURINI, K. S.; SILVA, L. C da. **Produção de frango de corte**. Espírito Santo, UFES, 2007, 9 p. Boletim Técnico - PIE-UFES:00107

SANTOS, I. I. **Promotores de crescimento na alimentação de frangos de corte: desempenho zootécnico e análise de resíduos (antimicrobianos) na cama de aviário**. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

SARCINELLI, M. F.; VENTURINI, K. S.; SILVA, L. C da. **Produção de frango de corte**. Espírito Santo, UFES, 2007, 9 p. Boletim Técnico - PIE-UFES:00107

SARMAH, A.; MEYER, M. T.; BOXALL, A. B. A. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. **Chemosphere**, v. 65, p. 725-759, 2006.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO PARANÁ. **Levantamento do uso e comercialização de medicamentos veterinários em frango de corte**. Disponível em: <<http://200.189.113.52/ftp/Visa/alimentos/Relatoriofrangodecorte.doc>>. Acesso em: 20 mar. 2011.

SISTEMA DE PRODUÇÃO DE AVES. Disponível em: <<http://www.mfrural.com.br/detalhes.asp?cdp=43574&nmoca=cama-de-frango-adubo-organico-de-granja>>. Acesso em: 08 abril. 2011.

SOUSA, I.C. Interação da Enrofloxacin com modelos biomembranares: influência das suas propriedades físicoquímicas. 2007. Dissertação (Mestrado em Tecnologia, Ciência e Segurança Alimentar) - Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Lisboa, Portugal, 2007.

Thompson M., Ellison S.L.R. and Wood R., Harmonised Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis (IUPAC Technical Report), Pure Appl. Chem., 74(5), 835-855, 2002

USLU, M. O. YEDILER, A.; BALCIOGLU, I. A.; SCHULTE-HOSTEDE, S. Analysis and sorption behavior of fluoroquinolones in solid matrices. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 190, p. 55-63, 2008.

VALENTE, L. P. V.; AUGUSTO, F.; RIEDO, C. R. F. **Análise quantitativa por cromatografia**. Disponível em: <<http://www.chemkeys.com/artigo/12/152/>>. Acesso em: 10 maio. 2011.

VIEIRA, M. I. **Criação de aves, atividade lucrativa - Rural News**. Disponível em: <<http://www.ruralnews.com.br/visualiza.php?id=430>>. Acesso em: 06 jun. 2007.

XIANG-GANG, H.; QI-XING, Z.; LIN, X. Determination of thirteen antibiotics residues in manure by solid phase extraction and high performance liquid chromatography. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 36, p. 1162-1166, 2008.

ZHAO, L.; DONG, Y. H.; WANG, H. Residues of veterinary antibiotics in manures from feedlot livestock in eight provinces of China. **Science of the Total Environment**, v. 408, p. 1069-1075, 2010.